

**Künstlich gespaltene Inteine für die Protein-Semisyntese –
Charakterisierung des *Ssp* DnaB Inteins und Modifikation des Ionenkanals
OmpF mit Hilfe des *Psp*-GBD Pol Inteins**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Steffen Brenzel
aus Fulda

Marburg/Lahn 2009

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von Professor Dr. Henning Mootz zunächst von Dezember 2004 bis Juni 2006 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt und anschließend im Zeitraum von Juli 2006 bis November 2009 an der Fakultät Chemie – Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund fortgeführt.

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Henning Mootz
Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung am:

Für meine Familie

And so castles made of sand slips into the sea,

Eventually

Jimi Hendrix

Zusammenfassung

Gespaltene Inteine sind leistungsfähige Werkzeuge zur Knüpfung nativer Peptidbindungen zwischen Polypeptidsequenzen. Die von ihnen vermittelte Protein *trans*-Spleißreaktion beginnt zunächst mit der Assoziation der Fragmente des gespaltenen Inteins, die Teile von zwei separaten Fusionsproteinen sind. Der gebildete spleißkompetente Intein-komplex schneidet sich anschließend aus dem Vorläuferprotein heraus und verbindet dabei die fusionierten Polypeptidsequenzen (N- und C-Extein) miteinander. Die Spezifität der Inteinassoziation verleiht dieser Ligationsreaktion einen höchst chemoselektiven Charakter.

Neben einigen natürlich vorkommenden Vertretern gewinnt die wachsende Zahl der auf künstliche Weise gespaltenen Inteine immer mehr an Bedeutung. Zur Erweiterung der Anwendungsbreite der Protein *trans*-Spleißreaktion wurde das *Ssp* DnaB Intein, dessen N- und C-terminalen Spleißbereiche nach Position 104 gespalten und von der integrierten Endonucleasedomäne befreit worden waren, in gereinigter Form und unter nativen Reaktionsbedingungen charakterisiert. Die Abhängigkeit der Spleißaktivität von einer forcierten Assoziation mit Hilfe der durch Rapamycin induzierten Heterodimerisierung der fusionierten FKBP- und FRB-Domänen stand im Fokus der Untersuchungen. Dabei zeigte sich, dass die Inteinfragmente selbst bereits eine ausgeprägte Affinität besaßen, die eine spontan einsetzende Protein *trans*-Spleißreaktion auch ohne induzierte Dimerisierung ermöglichte. Eine kinetische Analyse belegte zudem, dass die FKBP- und FRB-Assoziation weder auf die Reaktionsgeschwindigkeit noch auf die Ausbeute der Protein *trans*-Spleißreaktion einen positiven Effekt ausübte. Damit stellte das *Ssp* DnaB Intein das erste artifiziell gesplattene Intein mit spontaner Spleißaktivität dar, das *in vitro* keine denaturierende Präparation und anschließende gemeinsame Renaturierung der Inteinfragmente benötigte. Auf diese Weise wurden Anwendungen unter vollständig nativen Bedingungen zur Bewahrung der Aktivität nicht rückfaltbarer Proteine zugänglich. Ein Vergleich mit der Protein *trans*-Spleißreaktion des *Sce* VMA Inteins, für die eine induzierte Dimerisierung essentiell war, offenbarte ein ähnliches kinetisches Potential. Allerdings wurde für diese Reaktion ein biphasischer Verlauf beobachtet, der auf eine komplexere Kopplung der einzelnen Reaktionsschritte hinwies.

Eine weitergehende Anwendung der Protein *trans*-Spleißreaktion konnte durch die Protein-Semisynthese des Porins OmpF, das in die äußere Membran von *E. coli* integriert ist, durchgeführt werden. Der 340 Aminosäuren umfassende Ionenkanal wurde zunächst mit Hilfe des künstlich gespaltenen *Psp*-GBD Pol Inteins aus zwei rekombinant hergestellten und in 6 M Harnstoff solubilisierten Fragmenten wiederhergestellt. Durch Rückfaltung konnte der trimere Kanal mit nativer Aminosäuresequenz rekonstituiert werden. Elektrophysiologische Untersuchungen in einer planaren Lipiddoppelschicht (*Black Lipid Membrane*) belegten, dass auf diese Weise OmpF-Kanäle mit natürlicher Aktivität erhalten werden konnten. Darauf aufbauend wurde eine Strategie zur Herstellung eines semisynthetischen Porins entwickelt, die eine Kombination aus Cystein-Konjugation, Protein *trans*-Spleißen und Rückfaltung enthielt. Nach dem Einführen von Cysteinresten in die N- und C-terminalen OmpF-Fragmente sowie der Konstruktion einer Cystein-freien Mutante des *Psp*-GBD Pol Inteins konnte ein Benzo-18-Krone-6-Baustein durch Cystein-Konjugation (K16C) mit dem N-terminalen OmpF-Fragment verknüpft werden. Durch Protein *trans*-Spleißen wurde die Sequenz des OmpF-Derivats zusammengefügt und nach Rückfaltung der semisynthetische Ionenkanal mit trimerer Struktur erhalten. Der im Lumen der OmpF-Pore präsentierte Kronenether führte zu einem verringerten Leitwert des Ionenkanals. Diese Reaktionssequenz ermöglicht die chemo- und regioselektive Cystein-Konjugation innerhalb eines Fragments unabhängig von weiteren Cysteinresten in der komplementären Sequenz. Dies kann in Verbindung mit der Click-Reaktion als Ausgangspunkt für vielfältige weiterführende *Protein Engineering* Anwendungen genutzt werden. Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit neue Ansätze etabliert werden, die das Potential von gespaltenen Inteinen für die selektive chemische Modifikation von Proteinen demonstrieren und erweitern.

Summary

Split inteins are versatile tools for the ligation of polypeptide sequences via native peptide bonds. The protein *trans*-splicing reaction begins with the association of the intein fragments, which are parts of two separate polypeptide sequences. The splicing competent intein complex then mediates its own excision out of the precursor protein and concomitantly links the fused N- and C-extein sequences. The specific intein fragment association makes this ligation of two separately prepared protein fragments a highly chemoselective reaction.

Besides several naturally occurring examples the growing number of artificially split inteins becomes more and more important. To expand the scope of protein *trans*-splicing the *Ssp* DnaB intein, split after position 104 and lacking the endonuclease domain, was characterized *in vitro* under native conditions. The importance of assisted association via rapamycin-induced heterodimerization of the fused FKBP and FRB domains for the protein splicing activity was a major issue in this work. It was found that the intein fragments exhibited pronounced affinity resulting in spontaneous protein *trans*-splicing even without induced dimerization. Kinetic analyses revealed that the FKBP-FRB association had no positive impact on reaction kinetics and splicing yields. Therefore, the *Ssp* DnaB intein was the first artificially split intein with spontaneous *in vitro* splicing activity, which was independent of denaturation and subsequent renaturation of the mixed intein fragments. This can be very useful for applications under completely native conditions to preserve the activity of proteins, which are difficult to refold. In comparison, the rapamycin-induced protein *trans*-splicing reaction of the *Sce* VMA intein possessed a similar kinetic potential. A biphasic reaction progress, however, indicated a more complex coupling of the individual reaction steps.

In an advanced application, the protein *trans*-splicing reaction was used for the semisynthesis of the porin OmpF, which is integrated into the outer membrane of *E. coli*. The 340 amino acids comprising ion channel was reassembled from two recombinantly produced and solubilized protein fragments by means of the artificially split *Psp*-GBD Pol intein under 6 M urea conditions. The trimeric structure of the OmpF porin with native amino acid sequence could be reconstituted by refolding. Electrophysiological analyses in a planar lipid bilayer (black lipid membrane) proved the native activity of the reassembled OmpF ion channel. Based on these findings, a strategy for the production of a semisynthetic porin was developed combining cysteine conjugation, protein *trans*-splicing, and refolding. The incorporation of single cysteine residues into the N- and C-terminal OmpF fragments and the construction of a cysteine-free intein mutant facilitated the conjugation of a benzo-18-crown-6 building block with the N-terminal OmpF fragment (K16C). Protein *trans*-splicing produced the full-length sequence of the semisynthetic OmpF-derivative, which gave the trimeric pore upon refolding. The crown ether modification inside the pore lumen provoked a reduced channel conductance. This reaction sequence allows for the chemo- and regioselective cysteine conjugation within one fragment independent of more cysteine-residues within the complementary sequence. This in combination with the click reaction can open up new ways for the protein engineering of integral membrane proteins. In conclusion, new approaches could be established, which demonstrate and extend the potential of split inteins for the selective chemical modification of proteins.

Publikationen

Der Hauptteil dieser Arbeit wurde in den folgenden Publikationen veröffentlicht.

Steffen Brenzel, Thomas Kurpiers und Henning D. Mootz (2006)

Engineering artificially split inteins for applications in protein chemistry: biochemical characterization of the split *Ssp* DnaB intein and comparison to the split *Sce* VMA intein
Biochemistry, **45**, S. 1571-1578.

Steffen Brenzel, Menekşe Çebi, Philipp Reiß, Ulrich Koert und Henning D. Mootz (2009)

Expanding the Scope of Protein Trans-Splicing to Fragment Ligation of an Integral Membrane Protein: Towards Modulation of Porin-Based Ion Channels by Chemical Modification
ChemBioChem, **10**, S. 983-986

Weitere Publikationen:

Henning D. Mootz, Thomas Kurpiers, Christina Ludwig, Steffen Brenzel (2006)

Method for the production of a chemically modified protein

Verfahren zur Herstellung eines chemisch modifizierten Proteins

Patent Antrag; Pub. Nr.: WO/2007/076974; Int. Appl. Nr.: PCT/EP2006/012434

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
PUBLIKATIONEN.....	III
INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....	VI
ABKÜRZUNGEN	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 INTEINE UND PROTEIN-SPLEIBEN	2
1.1.1 Aufbau der Inteine.....	2
1.1.2 Der Mechanismus der Protein-Spleißreaktion.....	4
1.1.3 Vergleich einiger Inteinstrukturen	7
1.2 PROTEIN TRANS-SPLEIBEN: EINE HÖCHST CHEMOSELEKTIVE LIGATIONSREAKTION.....	9
1.2.1 Natürlich vorkommende gespaltene Inteine und ihre praktische Bedeutung	9
1.2.2 Konstruktion und Anwendungen von künstlich gespaltenen Inteinen	11
1.2.3 Die Cys-Tag-Technologie	13
1.3 CHEMISCHE UND ENZYMATISCHE LIGATIONSMETHODEN	14
1.3.1 Expressed Protein Ligation.....	15
1.3.2 Staudinger-Ligation	16
1.3.3 Reverse Proteolyse.....	18
1.3.4 Sortase-vermittelte Ligation.....	18
1.4 CHEMOSELEKTIVE MODIFIKATION VON PROTEINEN.....	19
1.4.1 Modifikation von Cystein-Seitenketten.....	19
1.4.2 Bio-orthogonale Konjugations- und Ligationsmethoden ohne Bildung einer Peptidbindung.....	20
1.5 ENTWICKLUNG VON IONENKANÄLEN	23
1.6 PORINE UND OMPF	29
1.7 AUFGABENSTELLUNG	31
2 MATERIAL	33
2.1 GERÄTE UND APPARATUREN	33
2.2 CHEMIKALIEN, ENZYME UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	34
2.3 VEKTOREN.....	35
2.3.1 pMAL-c2x.....	35
2.3.2 pTrc99a	35
2.3.3 pET-16b.....	36
2.3.4 pET-11c.....	36
2.3.5 pET-28a.....	36
2.3.6 pCR 2.1-Topo.....	36
2.4 MIKROORGANISMEN	37
2.4.1 E. coli DH5a	37
2.4.2 E. coli BL21 Gold (DE3).....	37
2.4.3 E. coli BL21 (DE3) omp8.....	37
2.4.4 E. coli XL10-Gold	38
2.5 MEDIEN	38
2.6 PUFFER UND LÖSUNGEN	38
3 METHODEN	41
3.1 KONSTRUKTION DER EXPRESSIONSPASMIDE.....	41
3.2 EXPRESSION UND PROTEINREINIGUNG.....	45
3.2.1 Heterologe Expression in E. coli Zellen.....	45
3.2.2 Zellaufschluss.....	45
3.2.3 Reinigung löslicher Proteine.....	46
3.2.4 Reinigung von Einschlusskörpern (inclusion bodies)	47

3.3	KINETISCHE ANALYSE DER PROTEIN <i>TRANS</i> -SPLAISREAKTION	47
3.3.1	Durchführung der Protein <i>trans</i> -Spleißreaktion	47
3.3.2	Auswertung der kinetischen Daten	47
3.3.3	Massenspektrometrische Analyse der Protein-Spleißreaktionen	50
3.4	PRÄPARATION UND ANALYSE DER TRIMEREN OMPF-PORE	51
3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode	51
3.4.2	Modifikation der Cystein-Mutanten von OmpF	51
3.4.3	Durchführung der 1,3-dipolaren Cycloaddition	52
3.4.4	Protein <i>trans</i> -Spleißen in Anwesenheit von 6 M Harnstoff	54
3.4.5	Reinigung der OmpF-Spleißprodukte	54
3.4.6	Rückfaltung der trimeren OmpF-Struktur	54
3.4.7	Reinigung des OmpF-Trimers	55
3.4.8	Messung des zirkulären Dichroismus	56
3.4.9	Einzelmolekül-Ionenkanalmessungen nach dem Black Lipid Membrane Verfahren	57
3.4.10	Massenspektrometrische Analyse der mit Trypsin verdauten Proteine	58
4	ERGEBNISSE	60
4.1	CHARAKTERISIERUNG DES GESPALTENEN SSP DNAB INTEINS	60
4.1.1	<i>In vitro</i> Experimente zur Bestimmung der Spleißaktivität unter nativen Bedingungen	61
4.1.2	Kinetische Analyse der Protein <i>trans</i> -Spleißreaktion	63
4.1.3	Vergleich mit dem gespaltenen Sce VMA Intein	65
4.1.4	Ein neues Intein aus <i>Clostridium kluyveri</i> ohne nucleophile Aminosäure an der N-terminalen Spleißstelle	68
4.2	FRAGMENT-LIGATION DURCH PROTEIN <i>TRANS</i> -SPLAISSEN: ZUSAMMENBAU DES PORINS OMPF MIT HILFE DES GESPALTENEN PSP-GBD POL INTEINS	70
4.2.1	Konstruktion der Intein-Fusionsproteine	70
4.2.2	Präparation von OmpF aus zwei Fragmenten durch Protein <i>trans</i> -Spleißen	72
4.2.3	Rückfaltung und Reinigung der trimeren OmpF-Pore	76
4.2.4	Elektrophysiologische Bestimmung der Ionenkanalaktivität	78
4.3	KONSTRUKTION EINES MODIFIZIERTEN IONENKANALS	82
4.3.1	Strategie zur chemo- und regioselektiven Modifikation des OmpF-Kanals	82
4.3.2	Präparation des modifizierten OmpF-Porins	85
4.3.3	Elektrophysiologische Funktionalitätsbestimmung	90
4.3.4	Weiterführende Modifikationen mit Hilfe der 1,3-dipolaren Cycloaddition	93
5	DISKUSSION	97
5.1	KINETISCHE BETRACHTUNG DER PROTEIN <i>TRANS</i> -SPLAISREAKTION	97
5.2	DAS GESPALTENE PSP-GBD POL INTEIN ALS WERKZEUG ZUR MANIPULATION UNLÖSLICHER MEMBRANPROTEINE	102
5.3	DIE ELEKTROPHYSIOLOGIE VON OMPF	103
5.4	DER KONSTRUIERTE IONENKANAL OMPF	107
5.4.1	Die molekulare Basis der veränderten Kanaleigenschaften	107
5.4.2	Vergleich mit analogen OmpF-Poren	110
5.4.3	Möglichkeiten weiterer Transformationen zur Etablierung künstlicher Selektivität	111
5.5	ALTERNATIVER ZUGANG ÜBER NATIVE CHEMICAL LIGATION	114
5.6	AUSBLICK	115
	LITERATUR	119
	ANHANG	128
A1	BESCHREIBUNG DER PROTEINE	128
A2	BESCHREIBUNG DER OLIGONUCLEOTID-SEQUENZEN	129
A3	SYNTHETISIERTE REAGENZIEN	132
	DANKSAGUNG	133

Abbildungen und Tabellen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des Protein-Spleißens.....	2
Abbildung 2:	Aufbau eines Vorläuferproteins mit integriertem Maxi-Intein.....	4
Abbildung 3:	Der Mechanismus der Protein-Spleißreaktion.....	6
Abbildung 4:	Kristallstrukturen eines Maxi-Inteins, eines konstruierten und eines natürlichen Mini-Inteins.....	7
Abbildung 5:	Protein <i>trans</i> -Spleißen eines gespaltenen Inteins.....	10
Abbildung 6:	Zweistufige Methode zur C-terminalen Modifikation von Proteinen mit Hilfe der Cys-Tag-Technologie.....	14
Abbildung 7:	Illustration der <i>Expressed Protein Ligation</i>	15
Abbildung 8:	Darstellung der Staudinger-Ligation.....	17
Abbildung 9:	Die spurlose Staudinger-Ligation.....	17
Abbildung 10:	Methoden zur chemoselektiven Modifikation von Cystein-Seitenketten.....	20
Abbildung 11:	Bio-orthogonale Reaktionen I.....	21
Abbildung 12:	Bio-orthogonale Reaktionen II.....	23
Abbildung 13:	Der Kaliumkanals KcsA.....	24
Abbildung 14:	Konstruktion eines photoschaltbaren Kaliumkanals.....	25
Abbildung 15:	Eine photokontrollierbare Variante des mechanosensitiven Kanals MscL.....	26
Abbildung 16:	α -Hämolsin als Nanosensor für das <i>Stochastic Sensing</i>	27
Abbildung 17:	Illustration eines Derivats von Gramicidin A (gA).....	28
Abbildung 18:	Kristallstrukturen des Porins OmpF.....	30
Abbildung 19:	Exemplarische Auswertung der kinetischen Daten einer Protein <i>trans</i> -Spleißreaktion.....	50
Abbildung 20:	Grundlegende Reaktion der BCA-Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	51
Abbildung 21:	Die Kupfer-katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition.....	53
Abbildung 22:	Apparatur zur Messung der Aktivität einzelner Ionenkanäle in einer planaren Lipiddoppelschicht (<i>Black Lipid Membrane</i>).....	58
Abbildung 23:	Protein <i>trans</i> -Spleißreaktion des geteilten <i>Ssp</i> DnaB Inteins unter nativen Bedingungen.....	62
Abbildung 24:	Kinetische Analyse der Protein <i>trans</i> -Spleißreaktion des gespaltenen <i>Ssp</i> DnaB Inteins zur Untersuchung des Einflusses fusionierter Dimerisierungsdomänen.....	64
Abbildung 25:	Kinetische Analyse der Protein <i>trans</i> -Spleißreaktion des gespaltenen <i>Sce</i> VMA Inteins.....	66
Abbildung 26:	Orthogonalität des <i>Ssp</i> DnaB und <i>Sce</i> VMA Inteins.....	68
Abbildung 27:	Die Protein-Spleißreaktion des <i>Ckl</i> PTerm Inteins.....	69
Abbildung 28:	Schematische Darstellung der Fusionsproteine des geteilten <i>Psp</i> -GBD Pol Inteins mit den Fragmenten des Porins OmpF.....	72

Abbildung 29: Präparation von OmpF aus zwei Fragmenten mittels Protein <i>trans</i> -Spleißen und Rückfaltung..	74
Abbildung 30: Präparation des OmpF-Derivats mit Insertion der Reste LEASGL.....	75
Abbildung 31: Eigenschaften des OmpF-Trimers.....	78
Abbildung 32: Typische Stromspur eines einzelnen aus der <i>E. coli</i> Membran extrahierten OmpF-Trimers nach dem BLM Verfahren.....	79
Abbildung 33: Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften der OmpF-Poren mit nativer Sequenz.....	81
Abbildung 34: Strategie zur Konstruktion eines semisynthetischen OmpF-Ionenkanals.....	84
Abbildung 35: Etablierung der Cystein-Modifikation von OmpF-Mutanten mit Fluoresceiniodacetamid.....	86
Abbildung 36: Präparation eines konstruierten Ionenkanals.....	89
Abbildung 37: Elektrophysiologische Analyse des konstruierten Ionenkanals.....	91
Abbildung 38: Protein-Modifikation durch kombinierte Cystein-Konjugation und 1,3-dipolare Cycloaddition.....	94
Abbildung 39: Stromspur eines sukzessiven Einbaus geöffneter OmpF-Kanäle in eine <i>Black Lipid Membrane</i>	103
Abbildung 40: Verhalten einer konstanten Anzahl von OmpF-Ionenkanälen in einer <i>Black Lipid Membrane</i> bei einem rampenförmigen Spannungsverlauf.....	105
Abbildung 41: Grafische Darstellung der einzelnen Messwerte von Monomerschließungen.....	110
Abbildung 42: Kristallstruktur einer synthetisch modifizierten OmpF K16C-Mutante.....	111
Abbildung 43: Schematische Darstellung des Potentialverlaufs entlang des Leitungswegs durch die OmpF-Pore.....	112
Abbildung 44: Reagenzien für eine Zweipunktaufhängung eines Kronenetherderivats in der OmpF-Pore.....	113
Abbildung 45: Konstruktion einer modifizierten OmpF-Pore durch <i>Native Chemical Ligation</i> und Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition.....	115

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.....	33
Tabelle 2: Liste der eingesetzten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	34
Tabelle 3: Daten der kinetischen Analyse der Protein <i>trans</i> -Spleißreaktionen des <i>Ssp</i> DnaB und <i>Sce</i> VMA Inteins.....	67
Tabelle 4: Kinetische Daten der Protein <i>trans</i> -Spleißreaktion einiger gespaltener Inteine.....	98

Abkürzungen

5-IAF	Fluorescein-5-iodacetamid
An	auf Anilinazid (40) basierendes Click-Produkt
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
ber.	berechnet
BLM	<i>Black Lipid Membrane</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	zirkulärer Dichroismus
<i>Ckl</i>	<i>Clostridium kluyveri</i>
Da	Dalton
Dan	auf Dansylalkin-Reagenz (39) oder -azid (47) basierendes Click-Produkt
DDM	Dodecyl- β -D-maltosid
DMF	Dimethylformamid
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq.	Äquivalent
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FKBP	FK506 bindendes Protein
Fl	auf Fluorescein-5-Iodacetamid basierendes Konjugat
F _M	FKBP F36M-Mutante
FRB	FKBP-Rapamycin-bindene Domäne
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
g	Erdbeschleunigung
G	geschlossener Zustand des OmpF-Porins
<i>G</i>	elektrischer Leitwert (Konduktanz)
gef.	gefunden
Gl.	Gleichung
gpD	Kopfprotein D des Bacteriophagen Lambda
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
His ₆ , His ₁₀	Sequenz aus sechs bzw. zehn Histidinen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Int ^C	C-terminales Inteinfragment
Int ^N	N-terminales Inteinfragment
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Krone	auf Kronenether-Iodacetamid-Reagenz (30) basierendes Konjugat
LB-Medium	Luri-Bertani Medium
M	mol/l (Einheit der Stoffmengenkonzentration)

MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MBP	Maltose-bindende Protein
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
MWCO	Ausschlussmolekulargewicht (<i>molecular weight cut off</i>)
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
N ₃	Azidgruppe präsentierendes Konjugat (basierend auf Reagenz 37)
NTA	Nitrilotriessigsäure
O1-3	Anzahl der geöffneten Monomere innerhalb eines OmpF-Trimers
OD	optische Dichte
OmpF	Porin der äußeren Membran von <i>E. coli</i> (<i>outer membrane protein F</i>)
OPOE	<i>n</i> -Octylpolyoxyethylen
<i>P_{aktiv}</i>	prozentualer Anteil der spleißkompetenten Inteinkonstrukte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>Psp</i>	<i>Pyrococcus</i> sp. GB-D
<i>Psp</i> Pol ^N	N-terminale Hälfte (AS 1-440) des <i>Psp</i> -GBD Pol Inteins
<i>Psp</i> Pol ^C	C-terminale Hälfte (AS 441-537) des <i>Psp</i> -GBD Pol Inteins
R^2	Bestimmtheitsmaß
Rapa.	Rapamycin
Ref	Referenz
Rh	auf Rhodaminazid-Reagenz (38) basierendes Click-Produkt
<i>Sce</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Sce</i> VMA ^N	N-terminale Inteinhalfe (AS 1-184) des <i>Sce</i> VMA Inteins
<i>Sce</i> VMA ^C	C-terminale Inteinhalfe (AS 390-454) des <i>Sce</i> VMA Inteins
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP_0	durch experimentelle Fehler hervorgerufener Umsatz der Spleißreaktion beim Reaktionsstart
<i>Ssp</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803
<i>Ssp</i> DnaB ^N	N-terminale Inteinhalfe (AS 1-104) des <i>Ssp</i> DnaB Inteins
<i>Ssp</i> DnaB ^C	C-terminale Inteinhalfe (AS 382-429) des <i>Ssp</i> DnaB Inteins
Strep	Strep-Tag II (WSHPQFEK)
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UE	unbestimmte Einheit
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
-≡	Alkingruppe präsentierendes Konjugat (basierend auf Reagenz 38)

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	MW / g/mol	Seitenketten pK _a -Werte
Alanin	Ala	A	89	
Arginin	Arg	R	174	>12
Asparagin	Asn	N	132	
Asparaginsäure	Asp	D	133	3,7 - 4
Cystein	Cys	C	121	8,8 - 9,1
Glutamin	Gln	Q	146	
Glutaminsäure	Glu	E	147	4,2 - 4,5
Glycin	Gly	G	75	
Histidin	His	H	155	6,7 - 7,1
Isoleucin	Ile	I	131	
Leucin	Leu	L	131	
Lysin	Lys	K	146	9,3 - 9,5
Methionin	Met	M	149	
Phenylalanin	Phe	F	165	
Prolin	Pro	P	115	
Serin	Ser	S	105	
Threonin	Thr	T	119	
Tryptophan	Trp	W	204	
Tyrosin	Tyr	Y	181	9,7-10,1
Valin	Val	V	117	

1 Einleitung

Die noch relativ junge Disziplin der Chemischen Biologie hat sich zur Aufgabe gemacht, biologische Prozesse mit chemischen Methoden zu studieren und zu kontrollieren. Mit diesem Ziel vor Augen kommen die vielfältigen Methoden der chemischen Synthese zum Einsatz, um Biomoleküle im Allgemeinen und Proteine im Besonderen zu manipulieren. Denn erst durch das Einführen geeigneter Reportergruppen oder Regulationseinheiten lassen sich deren biologische Funktion, Lokalisation in der Zelle, Interaktion mit weiteren Biomolekülen, Struktur und Dynamik sowie deren Biosynthese und Degradation mit allen Auswirkungen auf eine Zelle verfolgen und durch äußere Stimuli kontrollieren. Um dies zu erreichen, werden auf den Gebieten der Biokonjugation und Protein-Semisynthese immer zahlreichere Methoden etabliert. Unter Biokonjugation versteht man Prozesse, bei denen Biomoleküle entweder mit anderen biologisch aktiven Molekülen, mit kleinen organischen Substanzen oder mit festen Oberflächen durch eine kovalente Bindung verknüpft werden. Die Mehrzahl dieser Techniken wurde entwickelt, um Proteine mit anderen Proteinen oder mit kleineren Reportergruppen zu verbinden. Das Gebiet der Protein-Semisynthese befasst sich mit dem Zusammenbau von Proteinen aus rekombinanten und synthetischen Proteinfragmenten. Dabei kommen vorwiegend Ligationsmethoden zum Einsatz, um die leistungsstarke ribosomale Protein-Biosynthese mit den vielfältigen Möglichkeiten der Festphasen-Peptidsynthese zu koppeln. Die Ansätze der Biokonjugation und Protein-Semisynthese lassen sich synergistisch kombinieren und werden nicht streng voneinander abgegrenzt. Mit diesem Repertoire an Methoden kann unter anderem der Einbau von Aminosäuren mit unnatürlichen Funktionalitäten in synthetische wie rekombinante Segmente ebenso realisiert werden wie die direkte Umsetzung von Aminosäure-Seitenketten, die chemo-enzymatische Modifikation von Erkennungsbereichen, die chemoselektive Ligation von Peptiden und Proteinfragmenten sowie die Reaktion bio-orthogonaler funktioneller Gruppen, idealerweise sogar in zellulärer Umgebung. Der sequentielle Ablauf mehrerer Konjugations- und Ligationsschritte ermöglicht zudem den Zusammenbau von mehrfach modifizierten Proteinen aus mehr als zwei Segmenten, so dass sämtliche Bereiche eines Proteins prinzipiell zugänglich sind.

Der in dieser Arbeit umgesetzte Ansatz basiert auf der separaten Präparation und Modifikation von rekombinanten Proteinfragmenten, die in einem anschließenden chemo-selektiven Ligationsschritt miteinander verknüpft werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin begründet, dass einzelne funktionelle Gruppen eines Fragments zunächst separiert von weiteren gleichartigen oder störenden Funktionalitäten innerhalb eines komplementären

Fragments vorliegen können, bevor sie durch Ligation fusioniert und die aktiven Proteine rekonstituiert werden. Auf diese Weise lassen sich einzelne Funktionalitäten innerhalb eines Proteins auf chemo- und regioselektive Weise adressieren.

In diesem Kapitel soll ein Überblick über wichtige Methoden zur Ligation von Proteinen und Peptiden vermittelt sowie ausgewählte Methoden zu deren Modifikation vorgestellt werden. Der Fokus liegt dabei auf Ligationsreaktionen, die von Inteinen unter verschiedenen Bedingungen katalysiert werden können. Des Weiteren wird ein Einblick in die Konstruktion von Ionenkanälen mit veränderten Funktionalitäten gegeben, bevor das Zielprotein dieser Arbeit, das Porin OmpF, vorgestellt wird.

1.1 Inteine und Protein-Spleißen

Auf den ersten Blick sind Inteine zunächst nutzlose Parasiten innerhalb einer Reihe von Proteinen, die ihrem Wirtsorganismus keinen erkennbaren Vorteil zu verschaffen scheinen. Warum sie dennoch von großem Interesse für die Proteinchemie sind und wie sie ausgehend von ihrem Aufbau die Protein-Spleißreaktion katalysieren können, soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.1.1 Aufbau der Inteine

Inteine sind Polypeptidsequenzen, die zunächst als Insertion in einem Vorläuferprotein vorliegen. Durch die selbstprozessierende Protein-Spleißreaktion schneiden sie sich im Anschluss an die Protein-Biosynthese aus dem Wirtprotein heraus und verbinden dabei, wie in Abbildung 1 dargestellt, die als N- und C-Exteine bezeichneten flankierenden Polypeptidsequenzen und setzen dadurch erst das aktive Wirtprotein frei [1,2]. Auf diese Weise entstehen zwei unterschiedliche Proteine – die über eine native Peptidbindung verknüpften Exteine und das herausgeschnittene Intein – die von nur einem Gen kodiert werden. Zur Bezeichnung wurde eine zum RNA-Spleißen analoge Nomenklatur eingeführt [3], die jedoch

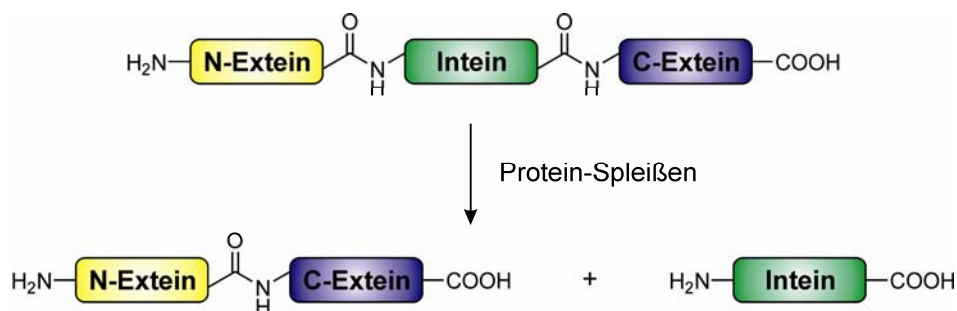


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Protein-Spleißens. Das Intein schneidet sich aus einem Vorläuferprotein in der Protein-Spleißreaktion heraus und verbindet dabei die flankierenden Exteinsequenzen über eine native Peptidbindung.

nicht darüber hinwegtäuschen sollte, dass die Protein-Spleißreaktion einen post-translationalen Autoprozessierungsprozess darstellt.

Inteine kommen in allen Bereichen des Lebens vor, in Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten, sowie in einigen Viren und Bakteriophagen; in mehrzelligen höheren Organismen sind bisher keine Beispiele bekannt. Seit der Entdeckung des ersten Inteins 1990 [4,5] wurden insgesamt über 300 weitere Vertreter aufgrund von Sequenzhomologien gefunden, da diese selbst in konservierten Bereichen zum Teil sehr unterschiedlich sind und insgesamt keine invarianten Reste besitzen [6-10]. Einen aktuellen Überblick vermittelt die Intein-Datenbank *InBase* [11]. Inteine umfassen eine Länge von 134-1986 AS und lassen sich anhand ihres Aufbaus und ihrer Funktionalität in drei Gruppen klassifizieren:

- Maxi-Inteine mit integrierter Homing-Endonucleasedomäne
- Mini-Inteine enthalten nur die N- und C-terminalen Spleißbereiche
- gespaltene Inteine, bei denen die N- und C-terminalen Spleißbereiche Teile zweier unterschiedlicher Vorläuferproteine sind.

Der typische Aufbau der größten Gruppe, den Maxi-Inteinen, ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Die N- und C-terminalen Spleißbereiche Int^N und Int^C mit einer Länge von etwa 100-150 bzw. 30-50 Aminosäuren werden durch eine Homing-Endonucleasedomäne voneinander getrennt. Diese kann, abhängig von ihrer Erkennungssequenz und dem Vorhandensein verschiedener Linkerbereiche oder in seltenen Fällen auch von Sequenzwiederholungen, sehr stark in ihrer Länge variieren. Prinzipiell sind demzufolge im Vorläuferprotein die Informationen für drei Funktionalitäten enthalten, die drei verschiedene Prozesse ermöglichen: Intein-vermitteltes Protein-Spleißen, horizontaler Gentransfer durch die Homing-Endonuclease und schließlich die Funktionalität des gespleißten Wirtsproteins. Die Endonucleasedomäne erlaubt es dem Intein, nachdem es in einen Organismus eingedrungen ist, durch Einführen eines Doppelstrangbruchs in dessen Intein-freie Allele, diese unter Ausnutzung der DNA-Reparaturmechanismen gegen das Intein enthaltende Gen auszutauschen (*intein homing*) und sich dadurch zu verbreiten [12]. Inteingene werden deshalb auch als parasitäre oder egoistische genetische Elemente bezeichnet, da sie aufgrund der bisher noch nicht erkennbaren biologischen Relevanz des Protein-Spleißens, dem Wirtsorganismus offenbar keine Vorteile verschaffen [13]. Die Insertionsstellen innerhalb der Wirtsproteine, die zum weitaus größten Teil Aufgaben im Bereich der DNA-Replikation oder -Reparatur wahrnehmen, liegen hauptsächlich in hochkonservierten Bereichen, so dass Inteine, die in verschiedenen Organismen an der gleichen Stelle in einem Wirtsprotein integriert sind, als unterschiedliche Inteinallele bezeichnet werden [11]. Dabei können bis zu

vier Inteine im selben Wirtspolprotein enthalten sein (*Ter* RIR1-1 bis 4, [14]). Aus dem überwiegenden Vorkommen in DNA-prozessierenden Proteinen wurde eine potentielle Regulation der Expression als mögliche biologische Funktion der Inteine abgeleitet. Etwa ein Fünftel aller bisher entdeckten Inteine sind Mini-Inteine, die anstelle der Endonucleasedomäne eine kurze Linkersequenz und mit etwa 150 Aminosäuren die minimale Ausstattung enthalten, die zum Protein-Spleißen notwendig ist. Das kleinste bekannte Intein ist mit 134 Aminosäuren das *Mth* RIR1 Intein aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* [15]. Aufgrund ihrer breiten phylogenetischen Verbreitung ist es wahrscheinlich, dass die Mini-Inteine ebenfalls einmal mobile genetische Elemente waren, die im Laufe der Evolution ihre Endonucleasefunktion verloren [16]. Auf die kleine Gruppe der gespaltenen Inteine und deren Besonderheiten wird in Kapitel 1.2.1 näher eingegangen.

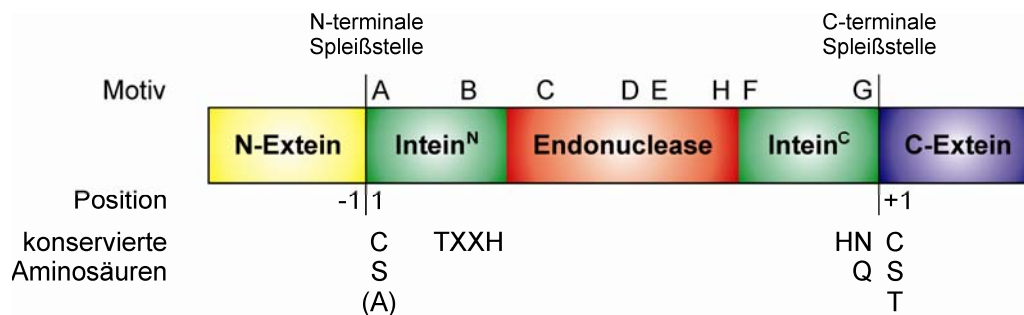


Abbildung 2: Aufbau eines Vorläuferproteins mit integriertem Maxi-Intein. Das N-Extein ist mit dem N-terminalen Spleißbereich (Int^N, Motive A und B) verbunden, während der C-terminale Spleißbereich (Int^C, Motive F und G) an das C-Extein angrenzt. Die dazwischen liegende Homing-Endonucleasedomäne (Motive C, D, E und H) wird für die Protein-Spleißreaktion nicht benötigt, ist aber für die genetische Propagierung essentiell. An den N- und C-terminalen Spleißstellen befinden sich die essentiellen nucleophilen Reste. Ein weiterer konservierter Bereich befindet sich innerhalb von Motiv B. Die Inteinaminosäuren werden von dessen N-Terminus her durchnummeriert, während die Exteinreste beginnend mit -1 bzw. +1 mit aufsteigenden Nummern in sich vom Intein entfernender Richtung bezeichnet werden.

1.1.2 Der Mechanismus der Protein-Spleißreaktion

Genaue Untersuchungen der Protein-Spleißreaktion sowie die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus wurden erst durch die Etablierung eines *in vitro* Protein-Spleißsystems ermöglicht, das die Reinigung eines ungespleißten Vorläuferproteins zuließ. Als Ausgangspunkt dafür diente das ursprünglich in der DNA-Polymerase enthaltene Intein des thermophilen *Pyrococcus* sp. GB-D (*Psp*-GBD Pol Intein), das in ungespleißter Form in einem heterologen Kontext bei tiefen Temperaturen präparierbar war, bevor durch Temperaturerhöhung die Protein-Spleißreaktion induziert werden konnte [17]. Ergänzend wurde das Intein der vakuolären ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae* (*Sce* VMA Intein, [4,5]) ausgenutzt, um die Reaktion durch Mutationen essentieller Reste auf bestimmten Zwischenstufen anzuhalten und entsprechende Intermediate chemisch nachzuweisen [18].

Abbildung 3 zeigt den aus diesen experimentellen Befunden abgeleiteten Mechanismus der Protein-Spleißreaktion, in deren Verlauf insgesamt zwei Peptidbindungen an den N- und C-terminalen Spleißstellen, also an den Verbindungsstellen des Inteins zu den beiden Exteinen, gespalten werden, um am Ende eine neue Peptidbindung zur Verknüpfung der Exteinsequenzen auszubilden [1,2,19]. Drei Reste sind dabei von essentieller Bedeutung: eine nucleophile Aminosäure am N-Terminus des Inteins (Cystein oder Serin an Position 1) und des C-Exteins (Cystein, Serin oder Threonin an Position +1) sowie ein Asparagin oder in einigen Fällen auch Glutamin oder Aspartat als letzte Aminosäure des Inteins. Diese Reste sind direkt an der aus vier Schritten bestehenden Reaktionsfolge beteiligt:

1. N-S-Acylverschiebung zur Aktivierung des N-Exteins als (Thio)ester
2. Umesterung zur Verbindung des N-Exteins mit dem C-Extein über eine (Thio)esterbindung (verzweigtes Intermediat)
3. Asparagin-Cyclisierung zur Abspaltung des Inteins
4. S-N-Acyltransfer zur Ausbildung einer stabilen Peptidbindung zwischen den gespleißten Exteinen.

Der einleitende Schritt der Protein-Spleißreaktion stellt einen nucleophilen Angriff der Sulfhydrylgruppe der Seitenkette des Cysteins an Position 1 auf die Carbonylfunktion der davor liegenden Peptidbindung an der N-terminalen Spleißstelle dar. Durch die resultierende N-S-Acylverschiebung wird das N-Extein als Thioester aktiviert [20]. In einem zweiten nucleophilen Angriff in diesem Fall der Seitenkette von Cys+1 an der C-terminalen Spleißstelle wird das aktivierte N-Extein in einer intramolekularen Umesterungsreaktion auf das C-Extein übertragen. Dabei bildet sich ein verzweigtes Thioester-Intermediat [17]. Aus diesem wird das Intein durch Cyclisierung des Asparaginrestes am C-Terminus des Inteins irreversibel als Succinimid abgespalten [21,22]. Bei dieser Reaktion greift der Stickstoff der Amidfunktionalität in der Asparagin-Seitenkette wahrscheinlich mit Hilfe des in den meisten Inteinen N-terminal zu findenden Histidins die Peptidbindung zwischen Intein und C-Extein an. Aus der Spaltung der Peptidbindung resultiert am C-Extein eine freie N-terminale Aminogruppe. Diese greift spontan die Thioesterbindung, über die das N- und C-Extein verbunden sind, nucleophil an, wodurch schließlich die Umlagerung zur stabilen nativen Peptidbindung eingeleitet wird [21]. Bemerkenswert ist hierbei, dass diese fein aufeinander abgestimmten nucleophilen Substitutionsreaktionen ohne Hilfe von Cofaktoren oder externen Energiequellen ablaufen. Allein das Intein enthält in seiner Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur alle Informationen, die für diese komplexe Reaktionssequenz nötig sind.

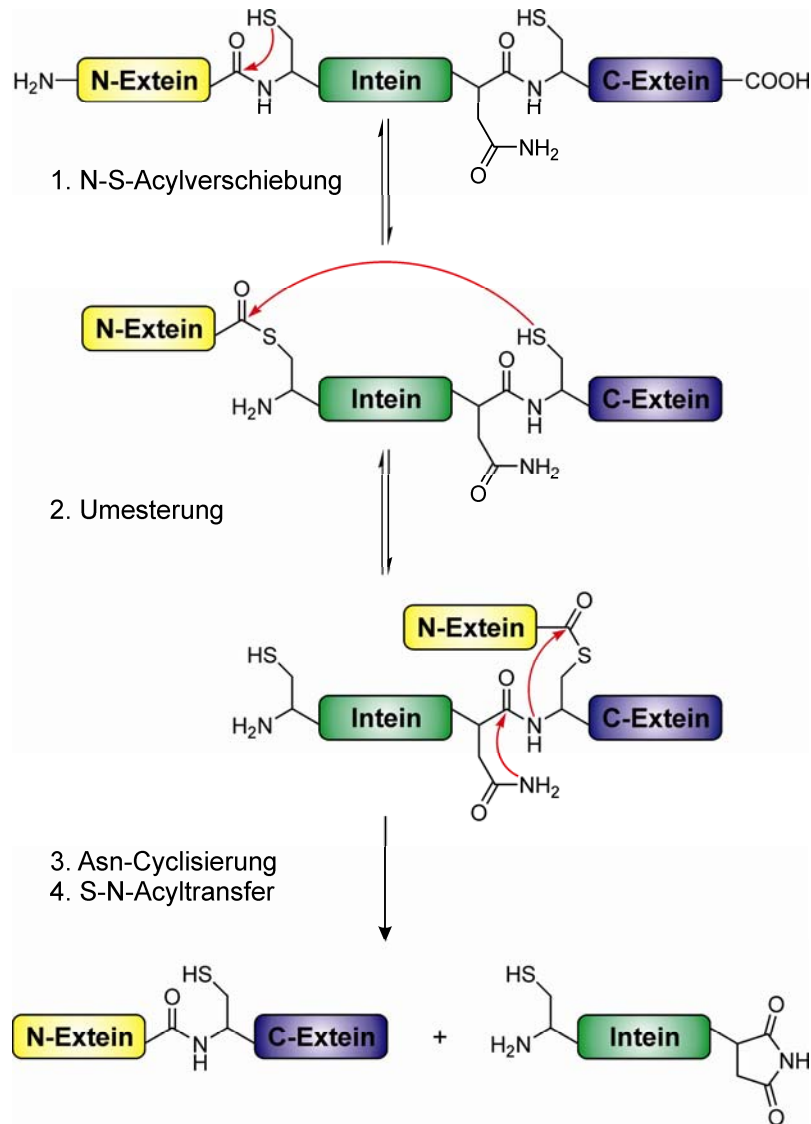


Abbildung 3: Der Mechanismus der Protein-Spleißreaktion. Eine Folge aus vier aufeinander abgestimmten nucleophilen Substitutionsreaktionen führt zur Spaltung der Peptidbindungen an der N- und C-terminalen Spleißstelle sowie zur Bindungsbildung zwischen den Exteinsequenzen. Das Auftreten von Serin oder Threonin anstelle von Cystein als nucleophile Aminosäuren führt zu den entsprechenden Oxoester-Intermediaten.

Störende Einflüsse z. B. durch die Verwendung nicht-nativer Exteinsequenzen oder Mutationen von essentiellen Resten können zum Abbruch der Protein-Spleißreaktion oder zum Auftreten von Nebenreaktionen führen [17,18]. Eine N-terminale Spaltung tritt dann auf, wenn der anfänglich gebildete Thioester an der N-terminalen Spleißstelle oder nach der Umesterungsreaktion durch äußere Nucleophile angegriffen und auf diese Weise das N-Extein freigesetzt wird, ehe sich die Peptidbindung zwischen den verbundenen Exteinsequenzen ausgebildet hat. Eine frühzeitige Asparagin-Cyclisierung führt dagegen zur Abspaltung des C-Exteins mit einem freien N-terminalen Cystein. Exemplarisch wurden hier nur die Reaktionen von Cystein an den essentiellen Positionen des Inteins beschrieben. Das Auftreten von Serin oder Threonin als nucleophile Aminosäuren ist ebenfalls möglich und führt zu den entsprechenden Oxoester-Intermediaten. Kombinationen von Cystein an der

N-terminalen und Serin oder Threonin an der C-terminalen Spleißstelle treten gleichermaßen auf, nicht jedoch die umgekehrte Variante. In Ausnahmefällen kommen an Position 1 auch nicht-nucleophile Aminosäuren wie Alanin, Prolin, Glycin, Asparagin, Glutamin oder Methionin vor. In diesen Fällen wird ein direkter Angriff des +1 Nucleophils auf die Peptidbindung der N-terminalen Spleißstelle angenommen [23].

1.1.3 Vergleich einiger Inteinstrukturen

Aufschlussreiche Einblicke in die Selbstprozessierung von Inteinen gewähren die in Abbildung 4 dargestellten Kristallstrukturen von einem Maxi-Intein (A) und zwei Mini-Inteinen (B und C). Obwohl die Aminosäuresequenzen kaum konserviert sind, besitzen alle drei Inteindomänen eine gemeinsame, vorwiegend aus β -Faltblättern aufgebaute hufeisenförmige Struktur mit pseudo-zweizähliger Symmetrie. Dieses als HINT-Modul (Hedgehog-INTein) bezeichnete Faltungsmotiv zeigt große Ähnlichkeiten mit der C-terminalen Autoprozessierungsdomäne von Hedgehog-Proteinen, die analog einen N-S-Acyltransfer zur Aktivierung ihrer N-terminalen Domäne katalysieren. Letzere wird dann aber durch einen nucleophilen Angriff von Cholesterol freigesetzt, um ihren Aufgaben bei Entwicklungsprozessen von bestimmten höheren Eukaryoten nachzugehen. In Abbildung 4A ist der Aufbau des bifunktionalen *Sce* VMA Maxi-Inteins aus zwei diskreten Domänen gut zu erkennen [24]. Die in rot dargestellte Homing-Endonucleasedomäne (PI-*Sce*I) ist nicht nur strukturell eigenständig, sondern auch funktional von den in grün dargestellten N- und

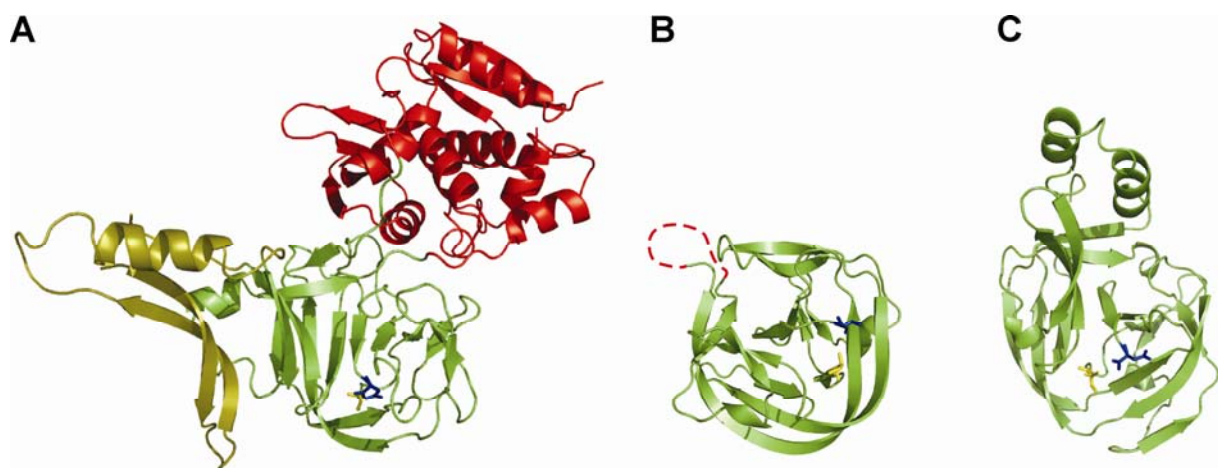


Abbildung 4: Kristallstrukturen eines Maxi-Inteins, eines konstruierten und eines natürlichen Mini-Inteins. (A) Struktur des *Sce* VMA Inteins mit Endonucleasedomäne (rot) und einer DNA-Erkennungsregion (olivgrün). Die N- und C-terminalen Aminosäuren im Zentrum der hufeisenförmigen Inteindomäne sind als gelbe bzw. blaue Stabmodelle dargestellt. Als Grundlage wurde die PDB-Datei 1vde verwendet. (B) Zur Strukturaufklärung des *Ssp* DnaB Mini-Inteins wurde dessen Endonucleasedomäne deletiert, so dass sich an dieser Stelle eine flexible Schleife (rot gestrichelt angedeutet) ausbildete (PDB-Datei: 1mi8). Je zwei Exteinreste sowie das mutierte Ala1 sind farblich hervorgehoben. (C) Struktur des natürlichen Mini-Inteins *Mxe* GyrA (PDB-Datei: 1am2). Alanin als einziger N-Exteinrest sowie der N- und C-Terminus des Inteins sind farblich markiert.

C-terminalen Spleißbereichen unabhängig. Sie konnte ebenso wie im Intein der Helicase DnaB des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Ssp* DnaB Intein, [25]) entfernt werden, ohne die Spleißaktivität gravierend zu beeinflussen [26,27]. Das so erhaltene *Ssp* DnaB Mini-Intein ist in Abbildung 4B in einer spleiß-inaktiven Form mit den Mutationen der essentiellen Reste Cys1Ala und Asn154Ala gezeigt [28]. Mit den enthaltenen je fünf nativen Exteinresten kommt die vorgestellte Struktur einem ungespleißten Vorläuferprotein wahrscheinlich sehr nahe. Im Folgenden sollen nun einige strukturelle Voraussetzungen und angenommene Mechanismen erörtert werden, nach denen das Intein den Ablauf der Protein-Spleißreaktion ermöglicht. Die N- und C-terminalen Spleißbereiche assoziieren sehr stark über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen und positionieren die beiden Spleißstellen im Zentrum der aus zwei langen β -Faltblättern aufgebauten Hufeisenstruktur. Die am Ende von zwei benachbarten β -Strängen liegenden essentiellen Aminosäuren kommen sich erwartungsgemäß sehr nahe und bilden das aktive Spleißzentrum des Inteins. An der N-terminalen Spleißstelle bildet eine Thr-X-X-His Konsensus-Sequenz innerhalb von Motiv B über mehrere Wasserstoffbrückenbindungen ein katalytisches Zentrum zur Aktivierung der N-terminalen Spleißstelle und Stabilisierung eines postulierten tetraedrischen Übergangszustandes, was die Bildung des energetisch ungünstigen Thioester-Intermediats unterstützt. Das in Abbildung 4C dargestellte natürliche Mini-Intein der Untereinheit A der DNA-Gyrase aus dem *Mycobacterium xenopi* (*Mxe* GyrA Intein, [29,30]) enthält an dieser Stelle ein Oxyanionenloch, ähnlich dem von Serin-Proteasen. Darüber hinaus wird in dieser Struktur, die das Intein mit einer Cys1Ser-Mutation und nur einem Alanin als N-Extein zeigt, die zu brechende Peptidbindung durch eine Drehung in die *cis*-Konformation destabilisiert. Dieses Modell der Destabilisierung des Grundzustandes als Teil des Katalysemechanismus wird ebenfalls durch NMR-Studien in Lösung unterstützt [31]. Ein zweites, sehr nahe gelegenes katalytisches Zentrum wird von den Resten der Motive F und G des C-terminalen Spleißbereichs gebildet. Unter Zuhilfenahme besonders des vorletzten Histidins wird über ein Ladungsverschiebungsnetzwerk die Nucleophilie des N δ -Atoms der Asparagin-Seitenkette für den Angriff auf den Carbonylkohlenstoff der verdrehten Peptidbindung an der C-terminalen Spleißstelle erhöht. Der zu erwartende tetraedrische Übergangszustand könnte ebenfalls stabilisiert werden. Allerdings liegen die N- und C-terminalen Nucleophile des *Ssp* DnaB sowie des *Mxe* GyrA Inteins, die eine dem Vorläuferprotein ähnliche Struktur abbilden, für eine Umesterungsreaktion zu weit auseinander ($\sim 8,5$ Å). Im Gegensatz dazu kommen sich die Reste Cys1 und Asn454 in der Struktur des *Sce* VMA Inteins, die keine Exteinreste enthält und deshalb eher das bereits gespleißte Intein darstellt,

sehr nahe (2,6 Å). Ähnliche Abstände wurden abhängig vom Mutationsmuster auch mit Modellexteinen beobachtet (9 Å und 3,6 Å, [32,33]). Daraus lässt sich ableiten, dass nach dem ersten Schritt der Protein-Spleißreaktion eine Konformationsänderung anzunehmen ist, die beide reaktiven Zentren in räumliche Nähe bringen muss. Dies spricht erneut für eine genaue Harmonisierung der einzelnen Reaktionsschritte.

Zusammenfassend stellen Inteine eine Klasse von Autoprozessierungsproteinen dar, die einen eigenen komplexen Mechanismus zur Wahrnehmung ihrer Aufgaben entwickelt haben. Mit der wachsenden Anzahl von Genom-Sequenzierungen wird auch die Zahl der entdeckten Inteine weiter steigen, so dass vielleicht in näherer Zukunft genauere Aussagen über bisher ungeklärte Aspekte wie deren Evolution und biologische Relevanz getroffen werden können.

1.2 Protein *trans*-Spleißen: eine höchst chemoselektive Ligationsreaktion

Neben den bereits beschriebenen Inteinen, die in Vorläuferproteinen als komplette Polypeptidketten vorliegen, gibt es auch eine kleine Gruppe von gespaltenen Inteinen. Die von ihnen vermittelte Protein-Spleißreaktion *in trans* besitzt einige Charakteristika, die für interessante Anwendungen genutzt werden können. Die natürlichen Vertreter dieser Gruppe werden im Folgenden ebenso vorgestellt wie Methoden zur Erzeugung artifiziell gespaltenener Inteine sowie deren Anwendungen.

1.2.1 Natürlich vorkommende gespaltene Inteine und ihre praktische Bedeutung

Während über die biologische Bedeutung der Inteine nur spekuliert werden konnte, wurde 1998 in dem Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 das erste gespaltene Intein entdeckt [10,34]. Die Hälften des *Ssp* DnaE Inteins werden zusammen mit den jeweiligen Exteinen (DnaE^N-Int^N und Int^C-DnaE^C) von zwei unterschiedlichen Genen in weit auseinander liegenden Bereichen des Genoms kodiert, so dass in diesem Fall der Protein-Spleißreaktion *in trans* eine essentielle Bedeutung für den Zusammenbau der katalytischen Untereinheit α der DNA-Polymerase III zukommt. Für die Bildung des aktiven DnaE Proteins gilt als *conditio sine qua non*, dass die beiden Inteinhälften mit einer Länge von 123 und 36 Aminosäuren über ihre inhärente Affinität assoziieren und durch die korrekte Faltung das spleißaktive Intein zunächst konstituieren müssen, bevor es schließlich die Protein *trans*-Spleißreaktion vermitteln kann (Abbildung 5). Inzwischen wurden 13 weitere DnaE-Inteinallele in anderen Cyanobakterien

gefunden [11,35,36], von denen besonders das *Npu* DnaE Intein aus *Nostoc punctiforme* hervorgehoben sei [37]. Für dieses Intein konnte gezeigt werden, dass es von allen bisher untersuchten Inteinen die Protein *trans*-Spleißreaktion mit einer Halbwertszeit von nur etwa 60 Sekunden am effektivsten vermitteln kann [38]. Einen zweiten Prototyp neben den DnaE-Inteinallelen stellt das gespaltene *Neq* Pol Intein der DNA-Polymerase aus *Nanoarchaeum equitans* dar [39]. Die einzelnen Hälften gespaltener Inteine sind generell nicht aktiv und zeigen gegenüber anderen Zellbestandteilen keine erkennbare Reaktivität, wodurch die extrem hohe Chemoselektivität der Protein *trans*-Spleißreaktion begründet wird. Kreuzreaktivitäten wurden bisher nur zwischen Inteinallelen beobachtet.

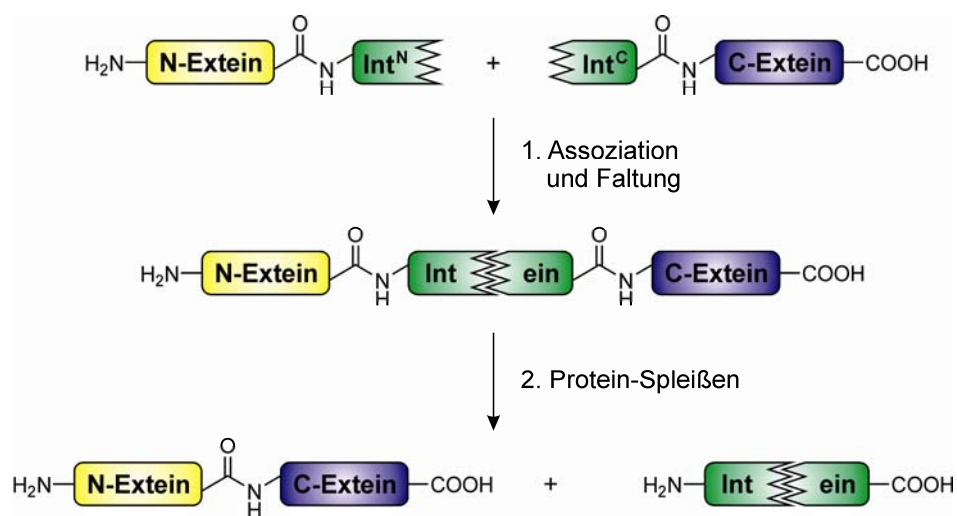


Abbildung 5: Protein *trans*-Spleißen eines gespaltene Inteins. Der eigentlichen Protein-Spleißreaktion müssen die Assoziation der Inteinhälften (Int^N und Int^C) sowie die Faltung des spleißaktiven Inteins vorangehen.

Die bedeutende Entdeckung, dass mit Hilfe der Protein *trans*-Spleißreaktion Proteinfragmente, die Bestandteile zweier unterschiedlicher Genprodukte sind, miteinander ligiert werden können, wurde im Folgenden auf vielfache Weise ausgenutzt. Mit dieser neuen Technologie konnten aktive Proteine aus zwei Fragmenten in Säugerzellkultur, transgenen Pflanzen und lebenden Mäusen zusammengesetzt werden, um Protein-Protein-Interaktionen oder Translokation in den Zellkern zu detektieren und um die Verbreitung von Resistenzgenen zu verhindern [40-42]. Des Weiteren wurde das gespaltene *Ssp* DnaE Intein zur Herstellung von cyclischen Peptiden und Proteinen, zur segmentellen Isotopen-Markierung von Proteinen *in vivo* für NMR-Studien, zur Immobilisierung von Proteinen auf festen Oberflächen, zur Protein-Semisynthese in Säugerzellen und zur Rekonstitution eines Proteins aus drei Fragmenten mit Hilfe eines zweiten, orthogonalen Inteins angewandt [43-46]. Die Vorteile der Protein *trans*-Spleißreaktion des *Ssp* DnaE Inteins liegen darin begründet, dass sie im Gegensatz zu chemischen Ligationsmethoden (Kapitel 1.3) für relativ

einfach durchzuführende Fragment-Ligationen *in vitro* wie auch *in vivo* eingesetzt werden kann.

1.2.2 Konstruktion und Anwendungen von künstlich gespaltenen Inteinen

Inspiziert von dieser Anwendungsbreite wurden weiterführende Versuche unternommen, ursprünglich *cis*-spleißende Inteine an geeigneter Stelle zu zerteilen, um künstlich gespaltene Inteine mit unterschiedlichen Eigenschaften für den Einsatz in der Protein *trans*-Spleißreaktion zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde vor allem die in Kapitel 1.1.1 beschriebene Eigenschaft ausgenutzt, dass in Maxi-Inteinen die N- und C-terminalen Spleißbereiche bereits durch die enthaltene Endonucleasedomäne voneinander separiert vorliegen. Diese Insertionsstellen erwiesen sich als ideale Ausgangspunkte, um durch Entfernen der Endonucleasedomäne spleißaktive gespaltene Inteine zu konstruieren. Auf diese Weise konnten aus dem *Ssp* DnaB Intein und dem *Mtu*-H37Rv RecA Intein aus *Mycobacterium tuberculosis* (bisher *Mtu* RecA Intein) aktive *trans*-spleißende Inteine entwickelt und zu Cyclisierungsreaktionen eingesetzt werden [27,47-51]. In einigen Fällen allerdings führte das Entfernen einzelner Reste der Endonuclease bereits zur Inaktivierung der getrennten Spleißbereiche. So konnten aus dem robusten *Psp*-GBD Pol Intein zwar zwei künstlich gespaltene Varianten durch das Einführen zweier verschiedener Spaltstellen entwickelt werden, die sogar in Anwesenheit denaturierender Agenzien noch aktiv waren; eine Reduktion der Inteingröße durch Herausschneiden der Endonucleasedomäne war dagegen nicht möglich [52]. Auf eine ähnliche Art konnten die beiden Inteinen der α -Untereinheit der Ribonucleosid-Diphosphat Reduktase aus *Pyrococcus furiosus* – *Pfu* RIR1-1 und *Pfu* RIR1-2 – für segmentelle Isotopenmarkierungen und Cyclisierungen in zwei Inteinhälften geteilt werden [53-55]. Neben den Maxi-Inteinen war es ebenfalls möglich, ausgehend von Mini-Inteinen ohne insertierte Endonucleasedomäne künstlich gespaltene Inteine zu erhalten. Zum einen konnte innerhalb des *Mxe* GyrA Inteins über Sequenzvergleiche mit Inteinallelen, die im Gegensatz dazu noch eine Endonucleasedomäne enthielten, ein flexibler Bereich identifiziert werden, in den eine heterologe Endonuclease insertiert und damit ein künstliches, bifunktionales Intein hergestellt werden konnte [56]. Durch eine Spaltung in diesem flexiblen Bereich konnte ein *trans*-spleißendes Intein von erheblicher Aktivität etabliert werden [57]. Zum anderen wurden auf ähnliche Weise mehrere Spaltstellen in das Intein des pre-mRNA-Spleißfaktors PRP8 der Pilzart *Penicillium*

chrysogenum (Pch PRP8) eingeführt, wovon zwei Varianten auch in geteilter Form noch Spleißaktivität zeigten [58].

Eine Besonderheit unter den künstlich gespaltenen Inteinen stellt das *Sce* VMA Intein dar. Durch Substitution der Endonuclease durch eine kurze Linkersequenz konnte ein aktives Mini-Intein konstruiert werden [26]. Eine Spaltung an dieser Stelle führte weiterhin zu zwei Inteinhälften ohne jegliche Affinität zueinander, die aber, durch fusionierte Affinitätsdomänen in räumliche Nähe gebracht, immer noch das spleißaktive Intein ausbilden konnten [59]. Mit der Anwendung dieses Inteins wurde schließlich das konditionelle Protein-Spleißen zugänglich, indem die N-terminale Inteinhälfte mit dem humanen FK506-bindenden Protein FKBP12 fusioniert wurde, während die komplementäre Inteinhälfte die FKBP-Rapamycin-bindende Domäne FRB der mTOR-Kinase FRAP trug. Die Protein *trans*-Spleißreaktion des künstlich gespaltenen *Sce* VMA Inteins war daraufhin von der Zugabe des zweizähnigen, überbrückenden Liganden Rapamycin abhängig, der zur Bildung eines ternären FKBP-Rapamycin-FRB-Komplexes und zur Initialisierung der Spleißreaktion führte [60-63]. In einem reziproken Ansatz wurde die Dimerisierung von FKBP F36M-Mutanten, fusioniert an beide Inteinhälften, durch Rapamycin verhindert. Damit konnte eine durch die Dimerisierung spontan einsetzende Protein-Spleißreaktion *in trans* durch den Ligand inhibiert werden [64,65]. Durch den Einsatz von Photodimerisierungsdomänen konnte die Reaktion des gespaltenen *Sce* VMA Inteins zudem lichtabhängig kontrolliert werden [66].

Eine von den bisherigen Ansätzen abweichende Herangehensweise zum Auffinden von Spaltstellen innerhalb und nicht zwischen den eigentlichen Spleißbereichen basierte auf Strukturdaten des *Ssp* DnaB Inteins. Spaltungen wurden dabei in mehreren Schleifenregionen zwischen den charakteristischen β -Faltblattsträngen vorgenommen, von denen sich drei als geeignet herausstellten, ein aktives *trans*-spleißendes Intein zu rekonstituieren [67]. Interessanterweise lag eine dieser Spaltstellen nur 11 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt, so dass die N-terminale Inteinhälfte zusammen mit einem modifizierten N-Extein mittels Festphasen-Peptidsynthese hergestellt werden konnte. Mit Hilfe der Protein *trans*-Spleißreaktion dieses semisynthetischen Inteins konnten unnatürliche Modifikationen *in vitro* auf mehrere Zielproteine übertragen werden, die an den 143 Aminosäuren langen C-terminalen Inteinteil fusioniert waren [68]. Darauf aufbauend wurde ebenfalls die Anwendbarkeit für *in vivo* Ligationen unter Beweis gestellt [69]. Eine analoge Methode zur C-terminalen Modifikation rekombinanter Proteine wurde mit Hilfe des semisynthetischen *Ssp* GyrB Inteins entwickelt. Ausgehend vom ursprünglich in der Untereinheit B der DNA-Gyrase von *Synechocystis* sp. PCC6803 vorkommenden Maxi-Intein wurde das entsprechend konstruierte

Mini-Intein zum Auffinden möglicher Spaltstellen eingesetzt, wobei sich eine spleißaktive C-terminale Inteinhälfte von nur sechs Aminosäuren ergab [70]. Diese beiden Systeme stellen einen enormen Fortschritt im Vergleich zu früheren Versuchen dar, semisynthetische Inteine zu etablieren, da anstelle der zuvor zu synthetisierenden C-terminalen Inteinhälften des *Mtu* RecA und *Ssp* DnaE Inteins mit einer Länge von 35-50 Aminosäuren nur noch sehr kurze Peptide (6-11 AS) als Inteinteile wirklich essentiell sind [71,72].

Protein-Spleißen *in trans* stellt insgesamt eine vielseitige Methode zur Ligation von rekombinant hergestellten Proteinen und Proteinfragmenten dar. Die getrennte Präparation der zu ligierenden Fragmente eröffnet zudem die Möglichkeit, unterschiedliche Modifikationen unabhängig voneinander über Biokonjugationsmethoden, Festphasen-Peptidsynthese oder Isotopenmarkierungen in die Fragmente einzubauen. Nach der Ligation finden sich die Modifikationen beider Fragmente im selben Zielprotein wieder. Trotz der vielseitigen Anwendungen waren zu Beginn dieser Arbeit noch keine artifiziell gespaltenen Inteine bekannt, die *in vitro* und unter nativen Bedingungen spontane Spleißaktivität zeigten.

1.2.3 Die Cys-Tag-Technologie

Die Kombination von Biokonjugation und anschließender Ligation mit Hilfe der Protein *trans*-Spleißreaktion wurde zu einer neuen Methode weiterentwickelt, um Proteine C-terminal auf chemo- und regioselektive Weise zu modifizieren [57,73]. Dazu wurde die einzigartige Reaktivität der Thiofunktion der Cystein-Seitenkette gegenüber allen anderen in Proteinen vorkommenden funktionellen Gruppen ausgenutzt. Wie in Kapitel 1.4.1 näher beschrieben, stehen eine Reihe von Reagenzien zur Verfügung, um Cysteinreste in Proteinen chemoselektiv zu alkylieren. Bei Proteinen mit mehreren oder essentiellen Cysteinresten ist eine regioselektive Adressierung nur eines einzelnen Cysteins dabei allerdings nicht möglich. Dies kann jedoch mit Hilfe der in Abbildung 6 veranschaulichten Cys-Tag-Technologie in einem zweistufigen Verfahren erreicht werden. Zunächst wird dabei eine kurze, das zu modifizierende Cystein enthaltende Peptidsequenz – der sogenannte Cys-Tag – mit einer Inteinhälfte fusioniert, die selbst kein Cystein enthält. Nach Modifikation und Reinigung des Cys-Tag-Konstrukts wird der modifizierte Cys-Tag durch die höchst chemoselektive Protein *trans*-Spleißreaktion auf ein Zielprotein übertragen, das als Fusion mit der komplementären Inteinhälfte vorliegt und dessen enthaltene Cysteinreste dabei unberührt bleiben. Zur Ligation solcher Cys-Tag-Sequenzen mit interessanten Zielproteinen eignen sich gespaltene Inteine, von denen jeweils mindestens eine Hälfte frei sein muss von störenden Cysteinen. Unter diesen Voraussetzungen wurde das künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB Intein ausgewählt, dessen

aus 48 Aminosäuren bestehende C-terminale Hälfte kein Cystein enthält und das zudem Serin als Nucleophil an der C-terminalen Spleißstelle benutzt. In weiterführenden Studien wurde wegen höherer Spleißausbeuten das künstlich gesplaltene *Mxe* GyrA Intein bevorzugt, dessen C-terminale Inteinhälfte die erforderlichen Kriterien ebenfalls erfüllte. Zur Etablierung der Methode wurden an beide Inteinhälften kurze, als C-Exteine fungierende Cys-Tag-Sequenzen (SIRSCGH₆ bzw. TEAGSCSH₆) fusioniert. Durch den Einsatz einer Auswahl von kommerziell erhältlichen Reagenzien konnten verschiedene Modifikationen wie Biotin, Fluoreszenzfarbstoffe und einige unterschiedlich lange Polyethylenglykol-Einheiten (PEG) mit dem Cys-Tag konjugiert und durch die anschließende Protein *trans*-Spleißreaktion auf eine Reihe von Zielproteinen übertragen werden [57,73].

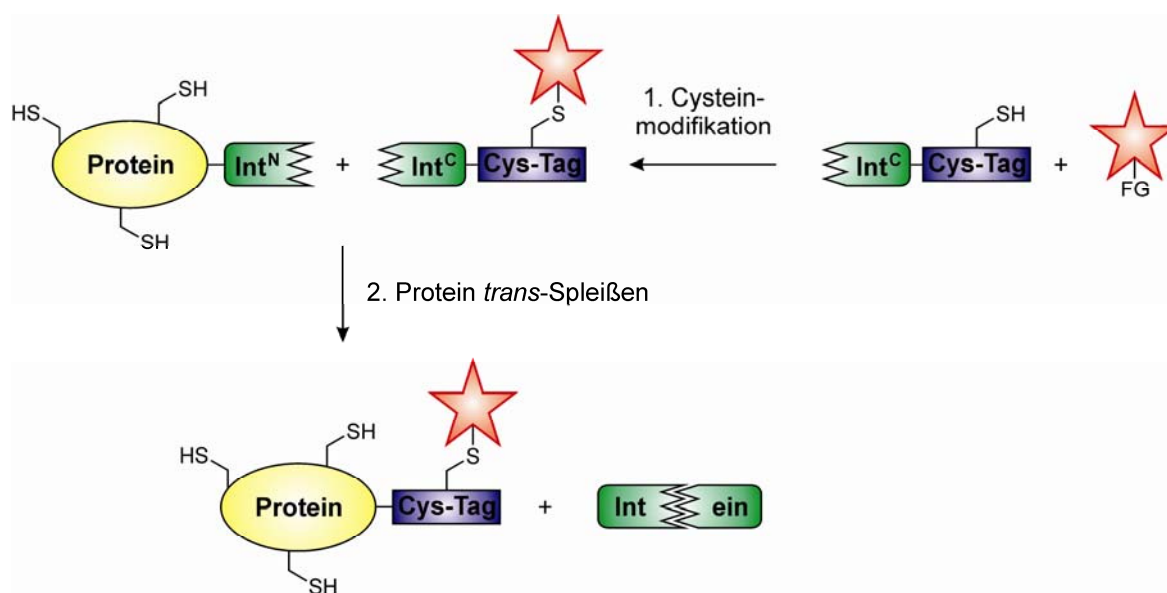


Abbildung 6: Zweistufige Methode zur C-terminalen Modifikation von Proteinen mit Hilfe der Cys-Tag-Technologie. Eine kurze Cys-Tag-Sequenz kann durch funktionelle Gruppen (FG) wie Maleinimide oder Iodacetamide chemoselektiv modifiziert werden. In einem zweiten Schritt wird die Modifikation im Lauf der Protein *trans*-Spleißreaktion auf ein Zielprotein übertragen. Auf diese Weise ist die chemo- und regioselektive Adressierung eines Cysteins neben weiteren Cysteinresten möglich. Reproduziert nach [73].

1.3 Chemische und enzymatische Ligationsmethoden

Chemoselektive Ligationen sind von essentieller Bedeutung für die Protein-Semisyntese. Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, um Proteine und Peptide miteinander zu verknüpfen [74]. Ihren chemoselektiven Charakter erlangen die nachstehend beschriebenen chemischen Methoden entweder dadurch, dass funktionelle Gruppen miteinander umgesetzt werden, die orthogonal zu den proteinogenen Funktionalitäten sind, oder dass auftretende Nebenreaktionen reversibel verlaufen und nur an der Ligationsstelle ein stabiles Produkt gebildet wird. Deshalb kann bei diesen Methoden auf den Einsatz von Schutzgruppen verzichtet werden. Zur enzymatischen Erkennung sind dagegen spezifische

Erkennungssequenzen innerhalb der Fragmente notwendig. Daher ist nur in ausgewählten Fällen eine spurlose Ligation möglich. Ein wichtiges gemeinsames Merkmal aller hier erwähnten Ligationsmethoden ist indessen die Bildung nativer Peptidbindungen an den Ligationsstellen.

1.3.1 Expressed Protein Ligation

Die wohl am weitesten verbreitete Methode zur Ligation von Peptiden, Proteinfragmenten und kompletten Proteinen stellt die *Expressed Protein Ligation* dar [75]. Diese nutzt die Reaktivität einer Thioesterfunktion am C-Terminus einer Polypeptidsequenz gegenüber einem Cysteinrest am N-Terminus einer zweiten Aminosäuresequenz. Wie in Abbildung 7B veranschaulicht, greift dabei das essentielle Cystein in einer intermolekularen Umesterungsreaktion die Carbonylgruppe des Thioesters an, so dass intermediär die Polypeptidsequenzen über eine Thioesterbindung verknüpft vorliegen. Analog zum Protein-Spleißen lagert sich der Thioester an der Ligationsstelle im abschließenden Schritt durch einen S-N-Acyltransfer spontan in eine stabile Peptidbindung um. Die einzige Anforderung an die zu ligierenden Sequenzen ist dabei das Vorhandensein eines Cysteins an der Ligationsstelle, das auch neben weiteren Cysteinresten vorliegen kann, da diese zwar die reversible Umesterung eingehen, aber keine stabilen Produkte bilden können. In der ursprünglichen Variante der *Native Chemical Ligation* wird der benötigte reaktive Thioester mittels Festphasen-Peptidsynthese hergestellt, wodurch der Einbau einer Fülle von unnatürlichen Bausteinen erreicht werden konnte, was aber gleichzeitig die Anwendbarkeit auf relativ kurze N-terminale Peptide beschränkte [76].

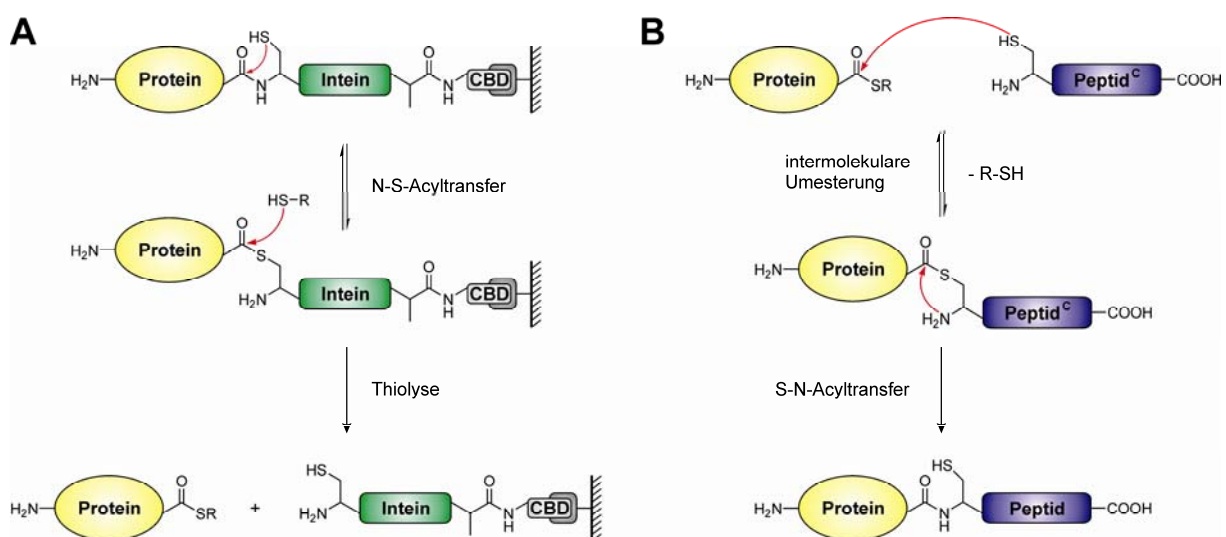


Abbildung 7: Illustration der *Expressed Protein Ligation*. (A) Generierung einer Thioesterfunktion am C-Terminus eines Zielproteins mit Hilfe eines spleißinaktiven Inteins. Die Chitin-bindende Domäne (CBD) ermöglicht die säulenchromatografisch durchführbare Thiolyse des Vorläuferproteins. (B) Mechanismus der Ligrationsreaktion.

Alanin lediglich die anfängliche N-S-Acylverschiebung eingehen können (siehe Abbildung 7A). Der gebildete Thioester an der N-terminalen Spleißstelle kann durch zugesetzte Thiole wie Thiophenolderivate oder Mercaptoethansulfonsäure (MESNA) gespalten werden. Die Immobilisierung des gesamten Fusionsproteins über eine ebenfalls enthaltene Chitin-bindende Domäne (CBD) ermöglicht außerdem die leichte Elution des freien C-terminalen Thioesters für anschließende Ligationsreaktionen [77]. Das N-terminale Cystein des Reaktionspartners kann ebenfalls mit Hilfe eines Inteins erzeugt werden. Hierzu muss die N-terminale Spleißstelle des Inteins durch Mutation des Nucleophils an Position 1 inaktiviert werden. Die unabhängig ablaufende C-terminale Spaltungsreaktion durch Asparagin-Cyclisierung führt zur Freisetzung des als C-Extein eingesetzten Zielproteins mit einem Cystein als erster Aminosäure. Darüber hinaus können freie N-terminale Cysteinreste generiert werden, indem eine Protease die Peptidbindung direkt vor dem freizusetzenden Cystein in einem Vorläuferprotein hydrolytisch spaltet.

Da die *Expressed Protein Ligation* nur mit solchen Proteinen spurlos durchführbar ist, die an der Ligationsstelle ein natürlich vorkommendes Cystein enthalten, wurden weiterführende Verfahren entwickelt, um diese Einschränkung zu umgehen. Eine Möglichkeit besteht darin, nach erfolgreicher Ligation das Cystein durch Desulfurierung in Alanin umzuwandeln [78]. Ferner können verwandte Aminosäuren wie Homocystein, Selenocystein und Methionin oder entfernbare Auxiliare eingesetzt werden [79-82]. Bei Zucker-unterstützten Ligationen werden thiolhaltige Zuckereinheiten von Glycopeptiden für den Einfang des Thioesters ausgenutzt, deren Thiolfunktion nach der Ligation entferntbar ist [83]. Mehrfragment-Ligationen können durch Maskierung von N-terminalen Cysteinresten oder durch Reaktionsführung unter kinetischer Kontrolle erreicht werden, wobei das unterschiedliche Reaktionsprofil von arylischen gegenüber aliphatischen Thioestern ausgenutzt wird [84,85]. Von den zahlreichen Anwendungen dieser Methodik [86-89] sei besonders auf ein in Kapitel 1.5 vorgestelltes Beispiel zur Semisynthese des Ionenkanals KcsA verwiesen.

1.3.2 Staudinger-Ligation

Ein eindrucksvolles Beispiel für die Weiterentwicklung einer bereits lange bekannten organisch-chemischen Reaktion für Anwendungen im Bereich der Proteinchemie liefert die Staudinger-Reaktion. In ihrem Verlauf reagieren eine Azidgruppe und ein Triarylphosphin unter Abspaltung von molekularem Stickstoff zu einem Aza-Ylid, das in Anwesenheit von Wasser sehr schnell hydrolysiert und ein Triarylphosphon sowie ein Amin freisetzt [90]. Die Staudinger-Reaktion wurde deshalb zur glatten Reduktion von Aziden zu Aminen eingesetzt.

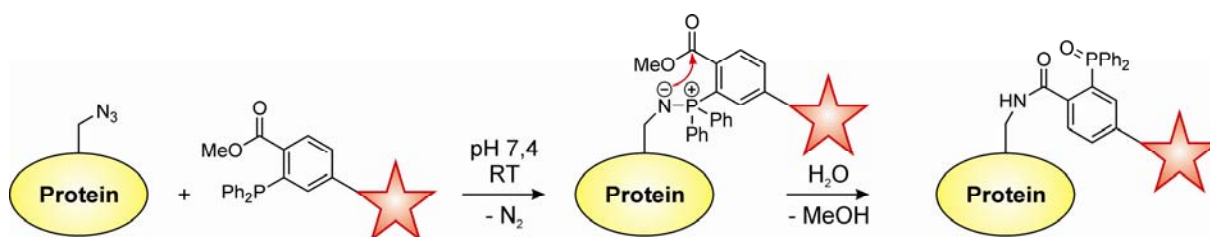


Abbildung 8: Darstellung der Staudinger-Ligation. Die Hydrolyse des Aza-Ylids wird durch einen intramolekularen Angriff auf eine elektrophile Esterfunktion in *ortho*-Stellung verhindert, was zu einer stabilen kovalenten Verknüpfung mit dem Phosphin-Reagenz führt.

Bei der weiterentwickelten Staudinger-Ligation wird hingegen die Hydrolyse des Aza-Ylids, wie in Abbildung 8 dargestellt, durch den Einsatz einer elektrophilen Falle bestehend aus einer Esterfunktion in *ortho*-Position eines Arylrests des Phosphins verhindert. Das stark nucleophile Stickstoffatom des Aza-Ylids greift in wässrigem Milieu und bei Raumtemperatur intramolekular den elektrophilen Ester an und wird auf diesem Weg mit dem Phosphin-Reagenz kovalent verknüpft [91]. Die Biokompatibilität dieser Ligrationsreaktion konnte durch die Modifikation von Azidosacchariden auf Zelloberflächen gezeigt werden, die durch Metabolisierung eines Azidozucker-Bausteins eingeführt wurden. Zur Ligation von Peptiden war allerdings der Einsatz einer neuen Generation von Reagenzien notwendig.

Mit Hilfe der spurlosen Variante der Staudinger-Ligation wurden schließlich Peptidligationen über native Peptidbindungen und prinzipiell ohne Sequenzanforderungen zugänglich [92-94]. Dazu müssen die in Abbildung 9B gezeigten Reagenzien in einem ersten Schritt zunächst mit einer N-terminal geschützten und C-terminal aktivierten Peptidsequenz

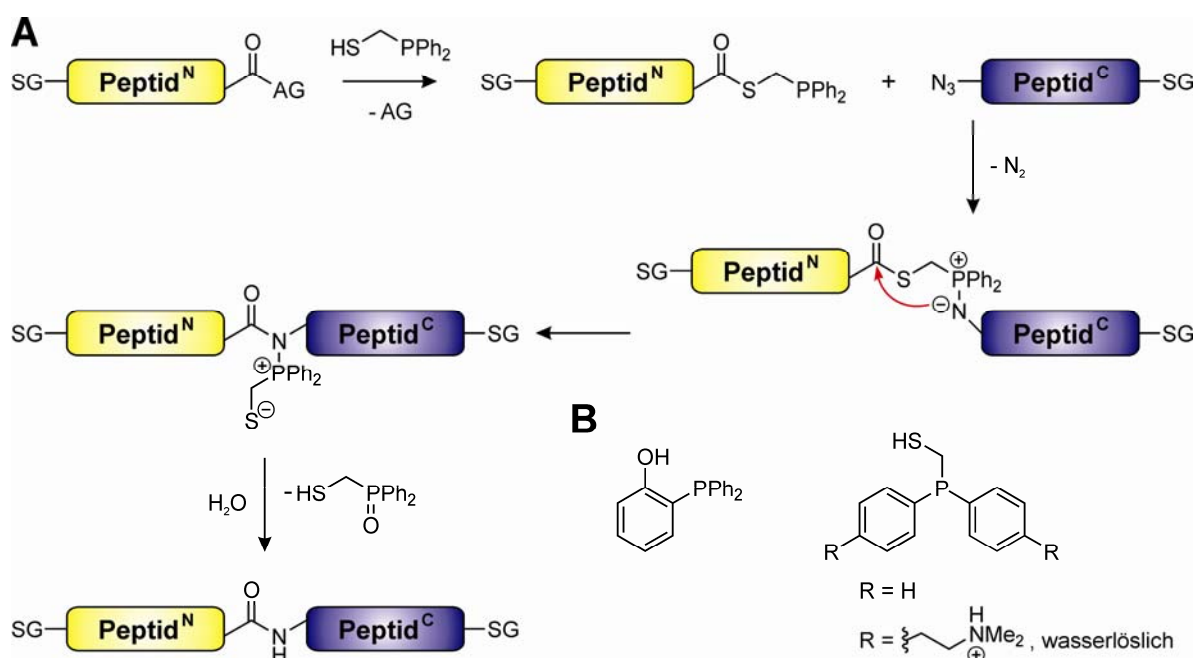


Abbildung 9: Die spurlose Staudinger-Ligation. (A) Die Reaktionsfolge beginnt mit der Acylierung des Phosphin-Reagenzes (SG: Schutzgruppe, AG: Abgangsgruppe) gefolgt von der Ligrationsreaktion der geschützten Peptide und hydrolytischen Abspaltung des umgesetzten Reagenzes. (B) Ausgewählte Phosphin-Reagenzien.

acyliert werden, bevor sie im eigentlichen Ligationsschritt mit einem vollständig geschützten Peptid mit N-terminaler Azidgruppe umgesetzt werden können (Abbildung 9A). Das Reagenz wird in einem abschließenden Hydrolyseschritt vollständig als Phosphon abgespalten. Die weiterentwickelten wasserlöslichen Reagenzien ermöglichten zudem die Übertragung eines rekombinant hergestellten Proteinfragments auf eine Sulfhydrylgruppe des Reagenzes. Die Bildung des Thioesters erfolgte dabei analog zur *Expressed Protein Ligation* mit Hilfe eines fusionierten Inteins [95]. Der Wert der Staudinger-Ligation in Kombination mit weiteren Methoden konnte bei der Synthese von RNase A aus drei Fragmenten unter Beweis gestellt werden [96].

1.3.3 Reverse Proteolyse

Ein weiteres interessantes Prinzip zur Knüpfung einer Peptidbindung stellt die Umkehrung der von Proteasen katalysierten Hydrolyse von Proteinen dar. Die Rückreaktion der Proteolyse kann in organischen Lösungsmitteln thermodynamisch begünstigt werden, so dass Proteasen, die für diesen Prozess optimiert wurden, zur Peptidligation eingesetzt werden können [97]. In einem kinetisch kontrollierten Ansatz wird das Peptid^N am C-Terminus als Ester oder Thioester aktiviert, damit es relativ schnell auf den nucleophilen Rest von Serin- und Cystein-Proteasen übertragen werden kann. Das angehäuften kovalent verbundene Peptid-Enzym-Intermediat kann nun vom Peptid^C aminolytisch gespalten werden, wodurch es zur Peptidligation kommt [98]. Die Verwendung von Substratmimetika, die eine erforderliche Erkennungssequenz als Teil der das Peptid^N aktivierenden Abgangsgruppe enthalten, eröffnet zudem den Zugang zu spurlosen Ligationsprodukten. Durch Mutationen zweier Reste im aktiven Zentrum der Serinprotease Subtilisin konnte die Peptid-Ligase „Subtiligase“ erhalten werden, mit deren Hilfe das Protein RNase A aus sechs Fragmenten zusammengesetzt werden konnte [99,100]. Die Methode der *Expressed Enzymatic Ligation* verbindet die Vorteile der Thioestergenerierung an rekombinanten Proteinen mit Hilfe von modifizierten Inteinen mit der reversen Proteolyse zur Erzeugung modifizierter Proteine [101].

1.3.4 Sortase-vermittelte Ligation

Enzyme mit der originären Aufgabe, die Ligation von Peptiden zu katalysieren, sind in der Natur nur sehr selten zu finden. Deshalb zog die Entdeckung der Enzymklasse der Sortasen entsprechend viel Aufmerksamkeit auf sich [102]. Die Transpeptidase Sortase A ist in der Membran von *Staphylococcus aureus* und anderen Gram-positiven Bakterien verankert und katalysiert die Verbindung von Oberflächenproteinen mit der Peptidoglycan-Zellwand. Die

Oberflächenproteine werden zu diesem Zweck innerhalb einer Leu-Pro-X-Thr-Gly Sortierungssequenz von einem katalytischen Cystein der Sortase nucleophil angegriffen, wodurch die Thr-Gly-Bindung gespalten und das Protein kovalent mit der Sortase verbunden wird. Diese erkennt ferner das Pentaglycin-Motiv des Peptidoglycans und koppelt dessen freie α -Aminogruppe mit den als Thioester aktivierten Oberflächenproteinen. Eine erfolgreiche heterologe Expression der Sortase A ohne ihre Membran-durchspannende N-terminale Domäne und die Toleranz gegenüber den zu ligierenden Sequenzen eröffneten breit gefächerte Anwendungen der Sortase-vermittelten Ligation [103]. Auf diese Weise konnten Peptide und Proteine mit einer C-terminalen LPXTG Sequenz und solche mit mindestens einem Glycin am N-Terminus quantitativ mit einer Peptidbindung verknüpft werden [104]. Die Methode erlaubt das Vorhandensein diverser Modifikationen innerhalb der Fragmente, die in gereinigter Form, in Zellextrakten oder auf Zelloberflächen eingesetzt werden können [105]. Ein offenkundiger Nachteil liegt allerdings in der Notwendigkeit von mindestens fünf Aminosäuren zur enzymatischen Erkennung an der Ligationsstelle, die auch nach der Reaktion im Ligationsprodukt verbleiben.

1.4 Chemoselektive Modifikation von Proteinen

Die chemoselektive Transformation einzelner funktioneller Gruppen innerhalb von Proteinen ist eine große Herausforderung für die Biokonjugationschemie. Die stringenteste Methode in dieser Hinsicht ist die direkte Modifikation von Aminosäure-Seitenketten, die für Cystein am weitesten verbreitet ist. Immer größere Bedeutung erlangt daneben der Einsatz bio-orthogonaler Reaktionen. Beide Ansätze werden in diesem Kapitel vorgestellt, wobei für detailliertere Betrachtungen auf die Literatur verwiesen wird [106]. Weitere in diesem Kontext zu nennende bedeutende Methoden sind der Codon-basierte Einbau unnatürlicher Aminosäuren, chemoenzymatische Verfahren zur Modifikation fusionierter Erkennungssequenzen und Verknüpfungen durch die Bildung von Chelatkomplexen, deren Beschreibung jedoch den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde.

1.4.1 Modifikation von Cystein-Seitenketten

Die Aminosäure Cystein lässt sich in mehrfacher Hinsicht von den übrigen proteinogenen Aminosäuren unterscheiden. Zum einen ist das relativ seltene natürliche Vorkommen ein besonderes Merkmal von Cystein und zum anderen ist es die einzige Aminosäure, die eine Thiofunktion in der Seitenkette trägt. Die Sulfhydrylgruppe besitzt im Vergleich zu Amino-, Carboxy- oder Hydroxylgruppen anderer Aminosäuren im deprotonierten Zustand die weitaus

höchste Nucleophilie. Darüber hinaus ist sie in der Lage, mit anderen Cysteinresten durch Oxidation reversibel Disulfid-verbrückte Cystine zu bilden. Durch die Zugabe von Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (DTT), β -Mercaptoethanol oder Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) können Disulfidbrücken gespalten und die freie Thiolfunktion wieder freigesetzt werden. Die hohe Nucleophilie sowie die Möglichkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken wurden zur Entwicklung von zwei Verfahren zur chemoselektiven Modifikation innerhalb von Proteinen ausgenutzt, die in Abbildung 10 aufgeführt sind. Im ersten Fall kann die Sulfhydrylgruppe mit Alkylierungsreagenzien wie Halogenacetamiden oder Maleinimiden umgesetzt werden. Nach nucleophiler Substitution bzw. Addition an den Michael-Akzeptor bilden sich dabei stabile Thioetherbindungen. Im zweiten Fall kommt es zwischen eingesetzten gemischten Disulfid-Reagenzien und der Cystein-Seitenkette zu einer Disulfid-Austauschreaktion. Das neu gebildete Disulfid zwischen Cystein und dem Reagenz kann unter reduktiven Bedingungen wieder gespalten werden [106].

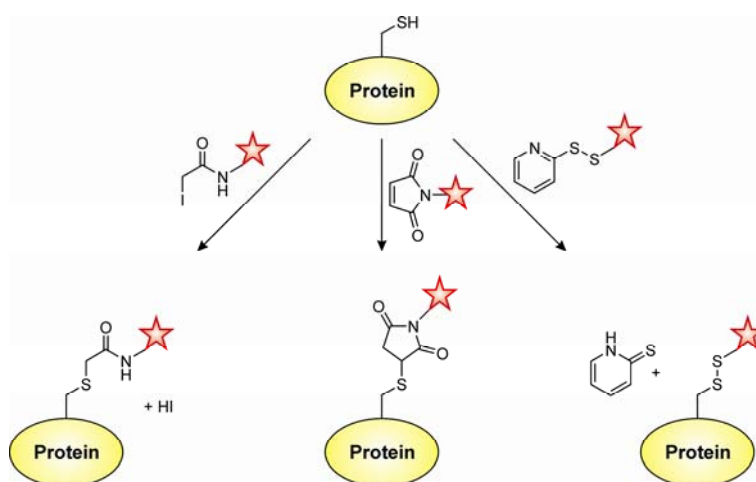


Abbildung 10: Methoden zur chemoselektiven Modifikation von Cystein-Seitenketten. Neben Alkylierungen mit Iodacetamiden oder Maleinimiden werden ebenfalls Disulfid-Austauschreaktionen angewandt.

1.4.2 Bio-orthogonale Konjugations- und Ligationsmethoden ohne Bildung einer Peptidbindung

Ein weit verbreiteter Trend in der Biokonjugationschemie besteht in der Anwendung von etablierten Reaktionen der chemischen Synthese auf ungeschützte Peptide und Proteine. Um dies zu realisieren, muss die Bio-Orthogonalität der infrage kommenden Reaktionen sichergestellt sein. Dies bedeutet zum einen, dass die eingesetzten Funktionalitäten, die chemoselektiv zu einer stabilen kovalenten Verknüpfung führen sollen, keine Nebenreaktionen mit den in Proteinen vorkommenden funktionellen Gruppen eingehen dürfen. Zum anderen müssen die Reaktionen so optimiert sein, dass sie unter annähernd

physiologischen Bedingungen und mit geringen Reaktantenkonzentrationen möglichst schnell und quantitativ ablaufen können. Idealerweise sollten darüber hinaus für potentielle *in vivo* Applikationen keine Reaktivitäten gegenüber jeglicher Art von Zellbestandteilen bestehen oder toxische Effekte zu erwarten sein. Der Preis der angestrebten hohen Chemoselektivität ist dabei allerdings, dass die Ligationen über nicht-native Verknüpfungen erfolgen, die sich unter Umständen negativ auf die strukturelle und funktionelle Integrität von Proteinen auswirken können. Nichtsdestotrotz werden immer neue Reaktionen zu Biokonjugations- und Ligationen eingesetzt, von denen wichtige aktuelle Vertreter in Abbildung 11 sowie Abbildung 12 aufgeführt sind. Die bereits in Kapitel 1.3.2 beschriebene nicht-spurlose Staudinger-Ligation, also die Reaktion einer Azidgruppe mit einem Phosphin-Reagenz mit anschließendem intramolekularem Abfang des Iminophosphoran-Intermediats, fällt ebenfalls in diese Kategorie.

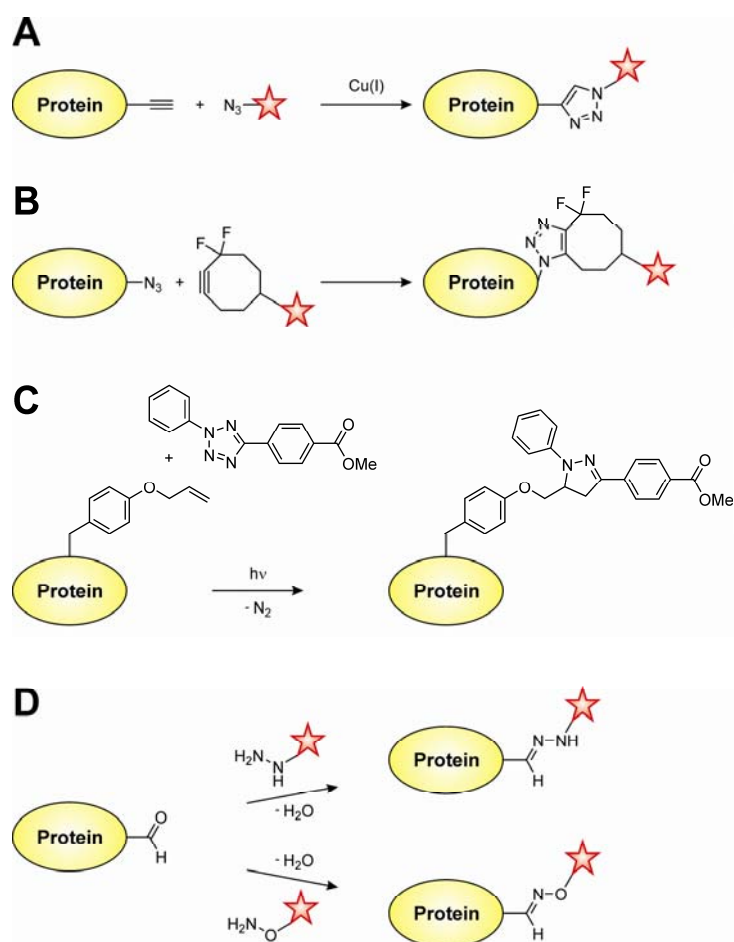


Abbildung 11: Bio-orthogonale Reaktionen I. (A) Die durch Cu(I) katalysierte dipolare 1,3-Cycloaddition (Click-Reaktion) zwischen einem Azid und einem terminalen Alkin. (B) Die durch Ringspannung getriebene Kupfer-freie Click-Reaktion. (C) Eine photoinduzierbare Click-Reaktion. (D) Hydrazid- und Oxim-Ligationen.

Die hohe Reaktivität der Azidfunktion wird ebenfalls bei der durch Cu(I) -Ionen katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition (Click-Reaktion) ausgenutzt [107,108], die in

Abbildung 11A dargestellt ist. Im Verlauf dieser sehr schnellen und höchst chemoselektiven Reaktion werden Azide mit terminalen Alkinen umgesetzt. Dabei bildet sich ein stabiler Triazolring an der Ligationstelle, wobei ausschließlich das 1,4-Regioisomer gebildet wird. Die generelle Anwendbarkeit der Click-Reaktion in Verbindung mit Peptiden, Proteinen, Oligosacchariden und Oligonucleotiden wurde in zahlreichen Studien unter anderem in Zelllysaten, auf Zelloberflächen und auf festen Phasen unter Beweis gestellt. Die Durchführbarkeit in lebenden Zellen wird durch die benötigten aber cytotoxischen Kupfersalze sehr stark limitiert und erst durch eine Kupfer-freie Variante realisierbar [109,110]. Bei dieser wurde die treibende Kraft der Ringspannung von Cyclooctinderivaten ausgenutzt, so dass auf einen Katalysator verzichtet werden konnte (B). Eine photoinduzierbare Click-Reaktion zwischen einem Tetrazol-Reagenz und einem Protein, das eine Alkeneinheit auf seiner Oberfläche trug (C), ließ sich sogar über die Bildung des fluoreszierenden Konjugationsprodukts in lebenden Zellen verfolgen [111,112].

Stabile Produkte werden auch bei durch Ligationsreaktionen unter Zuhilfenahme von Aldehyd- oder Ketogruppen erhalten (D). Die Umsetzung mit stickstoffhaltigen Nucleophilen wie Hydraziden oder Aminooxyverbindungen erzeugt stabile kovalente Verknüpfungen in Form von Hydrazonen und Oximen [113,114]. In Abbildung 12E ist dagegen der Angriff einer α -Aminogruppe von Cystein, Serin oder Threonin auf eine C-terminale Aldehydfunktion skizziert, der zunächst zur Bildung eines Imins führt, das intramolekular mit den nucleophilen Hydroxy- oder Sulfhydryl-haltigen Seitenketten unter Ausbildung von Oxazolidinen bzw. Thiazolidinen weiterreagiert. Das sekundäre Amin des fünfgliedrigen Rings greift abschließend die Esterfunktion an, wodurch eine Pseudoprolinstruktur am Verknüpfungspunkt entsteht [115].

Neueste Entwicklungen bedienen sich reaktiver Doppelbindungen von Alken- und Allyleinheiten [116]. So wurde die Diels-Alder-Reaktion zwischen einem C-terminalen 2,4-Hexadienylester und einer N-terminalen Maleinimidgruppe (F) zur Peptidligation, zur Protein-Modifikation und -immobilisierung eingesetzt [117]. Eine sehr schnelle Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf stellt die Reaktion zwischen einem Tetrazin und einem *trans*-Cycloocten dar, die auf Proteinoberflächen innerhalb weniger Minuten abläuft und selbst Zellbestandteile in Lysaten toleriert [118]. Die radikalische Addition eines Thiols an ein Alken, die sogenannte Thiol-En-Reaktion (G), kann photoinduziert oder mit Hilfe eines Radikalstarters mit ausreichender Selektivität durchgeführt werden, um Proteine mit glycosylierten Peptiden zu ligieren [119]. Das Potential der Kreuzmetathese zur Knüpfung von C-C-Doppelbindungen (H) wurde ebenfalls in ersten Versuchen auf Peptide und Proteine

angewandt [120,121]. Dabei wurde zunächst zur Erzeugung eines *S*-Allylcysteins innerhalb der Protease Subtilisin ein eingeführter Cysteinrest in Dehydroalanin umgewandelt und mit Allylthiol umgesetzt. Die besondere Reaktivität des *S*-Allylcysteins bei der Kreuzmetathese wurde zur Anknüpfung von Monosacchariden und Polyethylenglykoleinheiten ausgenutzt.

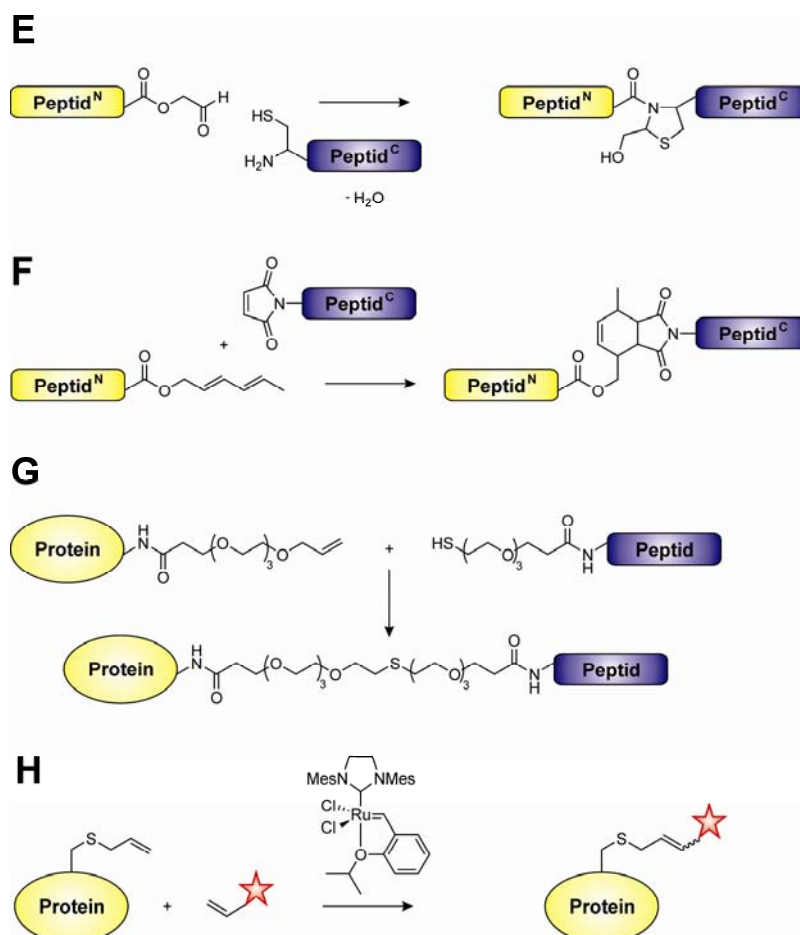


Abbildung 12: Bio-orthogonale Reaktionen II. (E) Die Thiazolidin-Ligation führt zu einer Pseudoprolinstruktur an der Lignationsstelle. (F) Diels-Alder-Reaktion (G) Thiol-En-Reaktion zwischen einem Thiol und einem Olefin. (H) Kreuzmetathese zur Knüpfung von C-C-Doppelbindungen.

1.5 Entwicklung von Ionenkanälen

Die Konstruktion von Ionenkanälen mit veränderten oder gänzlich neuen Funktionalitäten wie Selektivität, Leitfähigkeit, Öffnungs- und Schließverhalten sowie deren Kontrolle durch verschiedene Parameter wie Licht, Temperatur, Spannung und pH-Wert hat große Bedeutung für biochemische, biomedizinische sowie bio- und nanotechnologische Ansätze gewonnen. Aufgrund einer immer größer werdenden Fülle neuer Strukturdaten hat dieses weite Feld in den letzten Jahren enormen Aufwind genossen [122,123]. Im Folgenden sollen wichtige Beispiele vorgestellt und die zugrunde liegenden Konstruktionsprinzipien erläutert werden.

Auf der Grundlage der Struktur des Membran-durchspannenden Teils des tetrameren Kaliumkanals KcsA aus *Streptomyces lividans* konnte dessen Funktionsweise durch die Anwesenheit eines Selektivitätsfilters am extrazellulären Eingang erklärt werden [124]. Die Transmembranhelices der vier Monomere bilden einen zentralen Kanal, dessen Selektivitätsfilter von vier entlang der Symmetrieachse liegenden Rückgrat-Carbonylgruppen je Monomer der konservierten TVGYG Sequenz aufgebaut ist (Abbildung 13). Im leitenden Zustand ersetzen diese die Hydrathülle von vier Kaliumionen und unterstützen damit deren Eindringen in den Kanal [125]. Mit Hilfe der *Expressed Protein Ligation* wurde ein rekombinantes Kanalfragment als Thioester mit einem über Festphasen-Peptidsynthese hergestellten Peptid mit N-terminalem Cystein ligiert und durch Rückfalten der aktive, semi-synthetische Kanal erhalten [126,127]. Nach dieser Methode konnten innerhalb der TVGYG Sequenz, die Teil des synthetischen Fragments war, Veränderungen vorgenommen werden, die mit anderen Methoden nicht zugänglich waren. Zum einen wurde eine Peptidbindung durch eine Esterbindung ersetzt, ohne dass dabei größere strukturelle Auswirkungen auf den Selektivitätsfilters zu beobachten waren [128]. Die Ionenleitfähigkeit des Kanals sowie dessen Selektivität gegenüber verschiedenen Alkalimetallionen wurden indes signifikant verringert. Dies wurde auf die unterschiedlichen Dipoleigenschaften der Carbonylgruppe als Teil von Esterbindungen im Unterschied zu polareren Amidbindungen zurückgeführt. Zum anderen wurde Glycin am Ende der TVGYG Sequenz, das eine linksgängige helicale Konformation einnahm, wie sie sonst nur für D-Aminosäuren zugänglich ist, erfolgreich gegen D-Alanin

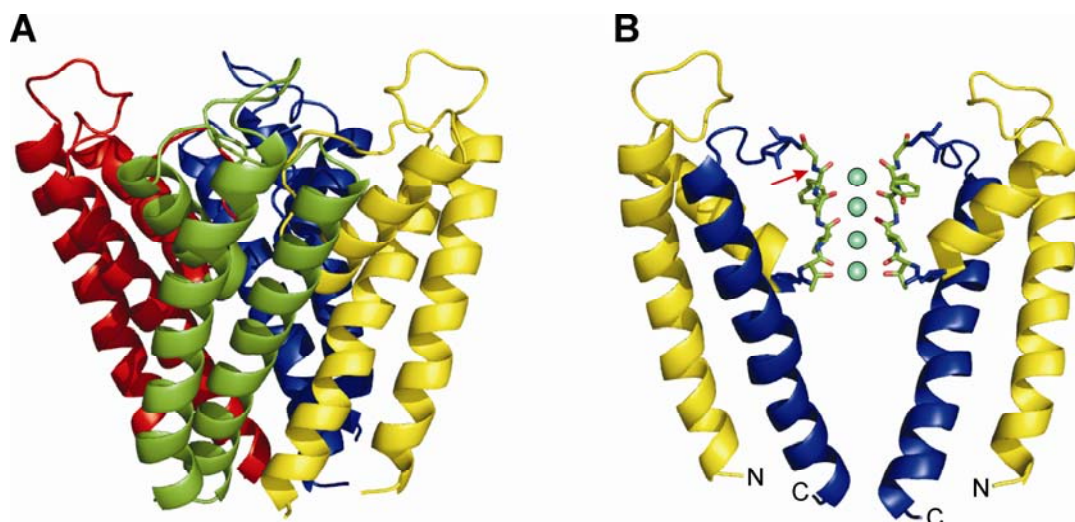


Abbildung 13: Der Kaliumkanal KcsA. (A) Kristallstruktur des tetrameren Kanals (PDB-Datei: 1bl8). Jedem Monomer wurde eine eigene Farbe zugeordnet. (B) Darstellung des Selektivitätsfilters, der aus den Carbonylgruppen der TVGYG Sequenz der vier Monomere aufgebaut ist, wobei nur zwei Monomere gezeigt sind. Die grünen Kugeln symbolisieren die vier Kaliumionen. Blau ist das Fragment dargestellt, das mittels Festphasen-Peptidsynthese mit N-terminalem Cystein hergestellt wurde, bevor es mit dem gelben rekombinanten, als Thioester erhaltenen Fragment ligiert wurde. Der rote Pfeil markiert die Amidbindung, die gegen eine Esterfunktion ausgetauscht wurde. Reproduziert nach [124,128].

ausgetauscht, praktisch ohne dabei die Kanalaktivität zu beeinflussen. Die Substitution gegen L-Alanin führte dagegen zu einer vollständigen Inaktivierung [129,130].

Ein photoinduzierbarer Ionenkanal wurde ausgehend vom Shaker H4 Kaliumkanal aus *Drosophila melanogaster* konstruiert [131]. Dieser ursprünglich spannungsabhängige Kanal konnte durch die Bindung quartärer Ammoniumionen an den Kanaleingängen fast vollständig inaktiviert werden. Ein solcher Blocker wurde zusammen mit einer photoschaltbaren Azobenzoleinheit und einer Cystein-reaktiven Maleinimidgruppe synthetisiert und auf ein durch Mutagenese eingeführtes Cystein in einer extrazellulären Schleifenregion übertragen. Wie in Abbildung 14 veranschaulicht, lag die Azobenzoleinheit im Grundzustand als gestrecktes *E*-Isomer vor, so dass der Abstand zwischen dem Aufhängepunkt und der Bindungsstelle der Ammoniumgruppe überbrückt werden konnte und der Kanal dadurch in einem inaktivierten Zustand vorlag. Bei Bestrahlung mit UV-Licht entfernte die photoinduzierte *E-Z*-Isomerisierung der Azogruppe den Blocker vom Kanaleingang und gab damit den aktiven Ionenkanal frei. Der reversible Prozess konnte im sichtbaren Licht wieder umgekehrt werden. Nach Expression in Oocyten von *Xenopus laevis* konnte auf diese Weise die Aktivität des Ionenkanals photochemisch kontrolliert werden.

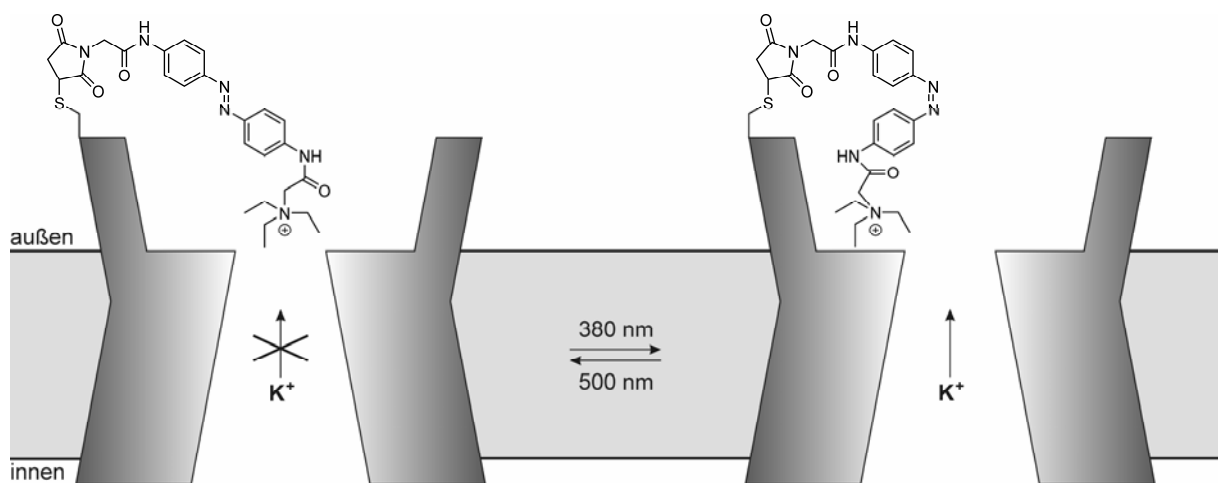


Abbildung 14: Konstruktion eines photoschaltbaren Kaliumkanals. Durch die photoinduzierbare *E/Z*-Isomerisierung der Azobenzolgruppe konnte die quartäre Ammoniumgruppe entweder am Kanaleingang positioniert oder von dort abgezogen werden. Verändert nach [131].

Nach einem analogen Mechanismus wurde eine photoinduzierbare Variante eines ionotropen Glutamatrezeptors (iGluR6) erhalten hergestellt [132,133]. Der tetramere Rezeptor des Zentralnervensystems von Säugern bindet im nativen Kontext den Neurotransmitter Glutamat und öffnet darauf seinen Leitungskanal für den Durchgang von Kalium- und Natrium- sowie in geringerem Umfang auch für Calciumionen. Glutamat bindet dabei an eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, die sich daraufhin wie ein Greifer schließt und eine

allosterisch bedingte Kanalöffnung der Transmembrandomäne hervorruft. Durch die kovalente Konjugation eines Glutamatderivats, das die bereits oben erwähnten Funktionalitäten besaß, mit einem geeignet positionierten Cystein der Ligandenbindungsdomäne konnte über die *E-Z*-Photoisomerisierung der Azobenzoleinheit der Abstand zwischen Ligand und Bindungsstelle kontrolliert werden. Erst eine Abstandsverkürzung durch den Übergang in die kompaktere *Z*-Konfiguration ermöglichte es dem immobilisierten Liganden, in die Bindungsdomäne hineinzuragen und eine Kanalöffnung zu bedingen. Die Photoisomerisierung und die damit verbundene Aktivierung des Ionenkanals konnte in humanen Zellkulturen und Neuronen von Zebrafischlarven (*Danio rerio*) mit hoher örtlicher und zeitlicher Auflösung durchgeführt werden [134].

Der mechanosensitive Kanal MscL (*mechanosensitive channel of large conductance*) aus *Escherichia coli* konnte ebenfalls unter die Kontrolle eines Photoschalters gestellt werden, wobei in diesem Beispiel die Aktivierung des pentameren Kanals durch elektrostatische Abstoßung erfolgte [135]. Zu diesem Zweck wurde in jedem Monomer ein eingeführtes Cystein mit Iodacetatderivaten modifiziert, die eine photoaktive Nitrobenzyl- oder Spiropyrangruppe enthielten, so dass im Kanalinneren fünf dieser Gruppen in räumlicher Nähe angeordnet waren (Abbildung 15). Mit Hilfe von UV-Licht wurde im ersten Fall die

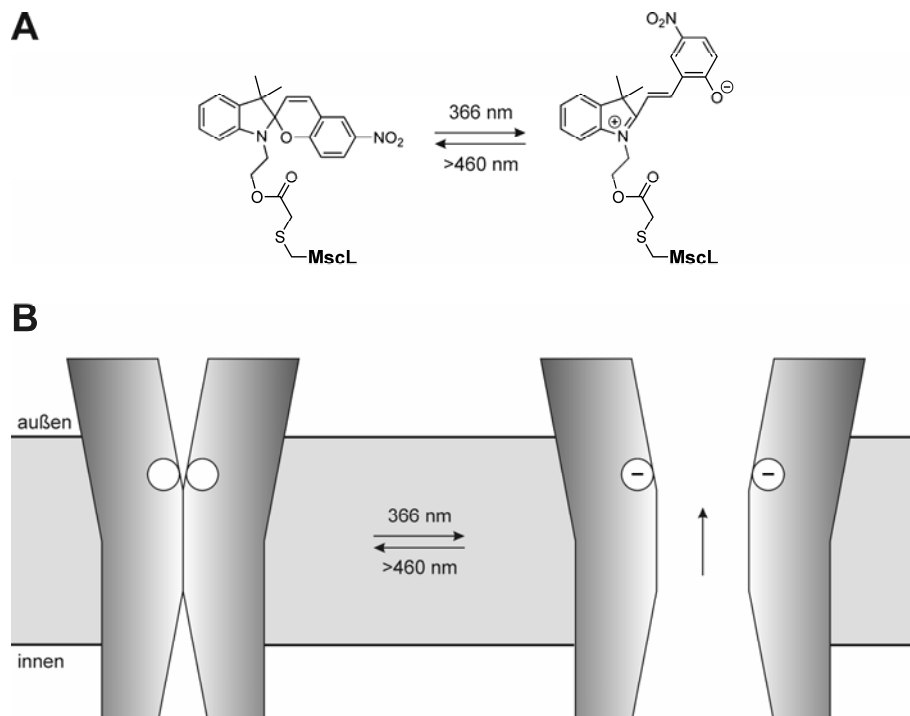


Abbildung 15: Eine photokontrollierbare Variante des mechanosensitiven Kanals MscL. (A) Reversible Überführung eines Spiropyran-Photoschalters in die zwitterionische Form. (B) Das Spiropyranderivat wurde mit einem in das Innere des Kanals eingeführten Cystein je Monomer konjugiert. Die durch Bestrahlung mit UV-Licht herbeigeführte Ladungstrennung bedingt die elektrostatische Abstoßung der Monomere und schließlich die Öffnung des pentameren Kanals. Vereinfachend sind nur zwei Monomere mit angedeuteter negativer Ladung dargestellt. Reproduziert nach [135,136].

Nitrobenzylgruppe irreversibel abgespalten, so dass je Monomer eine freie Carbonsäurefunktion an der Kanalinnenseite freigesetzt wurde. Die Spiropyrangruppe wurde ebenfalls durch Bestrahlung in die zwitterionische Form überführt, deren positive und negative Ladungen in der geschlossenen Pore bedingt durch elektrostatische Abstoßung die Kanalöffnung herbeiführten, in deren Verlauf die Transmembranhelices der einzelnen Monomere weiter auseinander drifteten. Im Falle der Spiropyrane konnte die Photoaktivierung reversibel in mehreren Zyklen durchgeführt werden, wobei die Inaktivierung im sichtbaren Bereich stattfand. Durch das Einführen titrierbarer stickstoffhaltiger Gruppen in den Kanal über Disulfidbrücken mit den erwähnten Cysteinresten konnte eine pH-abhängige Pore erhalten werden. Im Zuge einer Erniedrigung des pH-Werts wurden diese protoniert, was letztendlich wieder zu einer ladungsbedingten Porenöffnung führte [136].

Das Prinzip des *Stochastic Sensing* wurde mit Hilfe von α -Hämolysin aus *Staphylococcus aureus* verwirklicht [137]. Die relativ große und unselektive Pore aus sieben Monomeren konnte durch Punktmutagenese und Einführen von Adaptermolekülen wie β -Cyclodextrinderivaten so verändert werden, dass Bindestellen für vielfältige Substanzklassen wie Metallionen, Nucleoside, pharmakologisch relevante Verbindungen und diverse organische Moleküle entstanden. Abbildung 16 zeigt schematisch, wie Bindungsereignisse dieser Substanzen den Stromfluss einzelner Poren in charakteristischer Weise beeinflussen, so dass diese sogar in Gemischen identifiziert und ihre Konzentrationen bestimmt werden

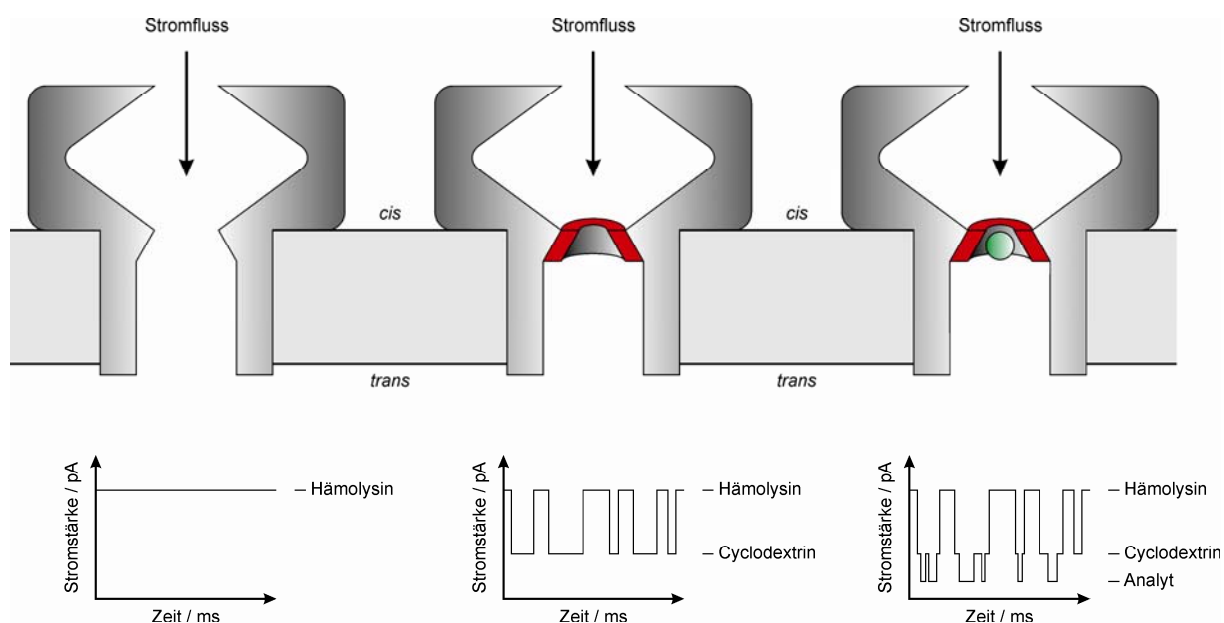


Abbildung 16: α -Hämolysin als Nanosensor für das *Stochastic Sensing*. Die weite Pore kann durch Adaptermoleküle wie β -Cyclodextrin (rot) verjüngt werden, wodurch Bindungsstellen für diverse Substanzklassen (grün) geschaffen werden. Bindungsereignisse können anhand der Modulation des Stromflusses durch die Pore (unten) detektiert werden. Schematisch reproduziert nach [137].

können. Der Einbau der β -Cyclodextrinderivate konnte nicht-kovalent an einer Bindungsstelle innerhalb der Konstriktionszone entsprechend der übereinstimmenden siebenzähligen Symmetrieeigenschaften von Pore und Adapter erfolgen oder durch Anknüpfung an geeignet positionierte Cysteinreste realisiert werden [138]. Das Potential dieses Biosensors reicht von Analytidentifizierung über Einzelmolekül-DNA-Sequenzierung bis hin zur Diskriminierung von Enantiomeren, Verfolgung von chemischen Transformationen einzelner Moleküle und der Suche nach Proteinkinase-Inhibitoren [139-143]. Eine weitere Pore, die den Anforderungen eines Nanosensors mit gebundenen Cyclodextrinadaptoren genügt, ist das modifizierte monomere *E. coli* Porin OmpG [144].

Einen bedeutend kleineren, aus zwei Peptiden von je 15 Aminosäuren zusammengesetzten Ionenkanal bildet Gramicidin A, ein Peptidantibiotikum produziert von *Bacillus brevis*. Nach der Insertion in die Cytoplasmamembran Gram-positiver Bakterien bilden Kopf-Kopf-Dimere der beiden aus alternierenden D- und L-Aminosäuren aufgebauten Peptide β -helicalen Kanäle mit einem Durchmesser von 4 Å und führen durch den unregulierten Fluss von monovalenten Kationen zur Depolarisation des Membranpotentials (Abbildung 17, [145,146]). Die Zugänglichkeit des Ionenkanals mittels Festphasen-Peptidsynthese ermöglichte verschiedene Ansätze zur Konstruktion neuer Funktionalitäten [147]. So konnte unter anderem die Eisenman-I-Selektivität für Alkalimetallionen in ihrer natürlichen Reihenfolge ($\text{Cs}^+ > \text{K}^+$) durch ein den Kanaleingang überspannendes Kronenetherderivat umgekehrt werden ($\text{K}^+ > \text{Cs}^+$) [148,149]. Die Größe des Kronenethers wurde dabei so gewählt, dass die

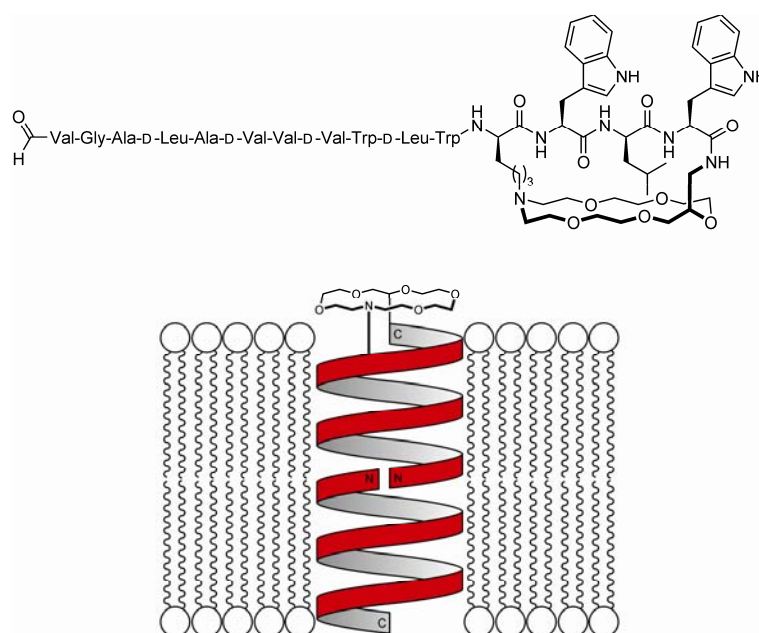


Abbildung 17: Illustration eines Derivats von Gramicidin A (gA). Der überspannende Kronenether führte zur Selektivitätsumkehr des Ionenkanals für Alkalimetallionen ($\text{Cs}^+ > \text{K}^+$ von natürlichem gA gegenüber $\text{K}^+ > \text{Cs}^+$ des Kronenetherderivats). Schematisch reproduziert nach [123,149].

koordinative Bindung von Kaliumionen eine maximale Bindungsenergie freisetzt [150]. Diese war erforderlich, um die im Vergleich zu den weichen Cäsiumionen höhere Dehydratationsenergie überzukompensieren, die bei der Passage durch den engen Kanal teilweise aufzuwenden ist.

1.6 Porine und OmpF

Gram-negative Bakterien wie *E. coli* besitzen zusätzlich zur Cytoplasmamembran und der umhüllenden Peptidoglycan-Zellwand noch eine zweite, äußere Membran. Diese trennt den periplasmatischen Raum zwischen den beiden Membranen von dem umgebenden Medium ab. Während der Stofftransport durch die Cytoplasmamembran in das Zellinnere auf äußerst spezifischen Transportmechanismen beruht und auf sehr komplexe Weise reguliert ist, erfolgt der Austausch von Nährstoffen und Abfallprodukten über die äußere Membran hauptsächlich durch passive Diffusion. Zu diesem Zweck sind in sehr hoher Kopienzahl Poren bildende Proteine, die Porine, notwendig [151]. Das in *E. coli* überwiegend vorkommende Porin OmpF (*outer membrane protein F*) gehört zur Klasse der allgemeinen Diffusionsporine, die relativ große, mit Wasser gefüllte Poren bilden und so die Passage von gelösten, hydrophilen Substanzen bis zu einer Größe von etwa 600 Da ermöglichen [152]. Durch diesen Siebeffekt schützt die äußere Membran die Zelle vor unerwünschten Substanzen wie z. B. manchen Antibiotika. Das 340 Aminosäuren umfassende OmpF-Porin wird cotranslational aufgrund einer zusätzlichen N-terminalen Signalsequenz von 22 Resten nach dem Sec-Translokationsmechanismus zur äußeren Membran befördert und nach Abspaltung der Signalsequenz dort in aktiver Form eingebaut. Weitere Vertreter der allgemeinen Porine sind die Proteine OmpC und PhoE, die abhängig vom Nährstoffangebot produziert werden. Die Aufgabe der spezifischen Porine wie LamB und Tsx hingegen ist es, den Durchgang spezifischer Substanzen wie Maltose und Maltodextrin bzw. Nucleosiden zu ermöglichen, für die sie passende Bindungsstellen besitzen. Das Porin OmpG besitzt im Unterschied zu den klassischen Porinen eine monomere Struktur mit einer deutlich größeren Pore und wird von *E. coli* unter normalen Laborbedingungen höchstens in Spuren exprimiert [153].

Im Gegensatz zu den integralen Proteinen der Cytoplasmamembran, deren hauptsächliches Strukturmotiv Transmembranhelices darstellen, ist den Porinen eine aus Membrandurchspannenden β -Fässern aufgebaute homotrimere Struktur gemein, wobei jedes Monomer eine unabhängige Pore innerhalb des Trimers bildet (Abbildung 18, [154]). Im Verlauf der 16 antiparallelen β -Stränge jedes OmpF-Monomers, die schräg zur Porenachse gegeneinander versetzt sind, wechseln sich hydrophobe Aminosäuren, deren Seitenketten mit der Membran

in Kontakt stehen, mit hydrophilen Resten ab, die in die wasserhaltige Pore hinein weisen [155]. Auf der periplasmatischen Seite werden die einzelnen Stränge über kurze β -Haarnadel-Schleifen (*β -hairpin turns*) verbunden, während auf der extrazellulären Seite lange flexible Schleifenregionen (*loops*, L1-L8) zu finden sind, von denen die Schleifen L2 und L3 von besonderer Bedeutung sind. Die Schleife L2 faltet sich in Richtung eines benachbarten Monomers und greift wie ein Haken in dessen β -Fass, so dass hydrophile Wechselwirkungen ausgebildet werden können, die zur Stabilität der trimeren Struktur maßgeblich beitragen [156]. Eine weitere Art der Stabilisierung findet an den Kontaktflächen der Monomere statt, an denen große hydrophobe Reste entlang der dreizähligen Symmetrieachse ineinander greifen und einen hydrophoben Kern bilden. Die ausgedehnte Schleife L3 ragt weit in das Poreninnere hinein und platziert einen kurzen α -helicalen Bereich auf halber Höhe der Pore. Auf diese Weise wird die elliptische Pore mit Abmessungen von $15 \times 22 \text{ \AA}$ an den Kanaleingängen durch die Position von L3 auf eine effektive Porengröße von $7 \times 11 \text{ \AA}$ verjüngt, wodurch das Lumen eine Form ähnlich einer Sanduhr annimmt. An der Stelle der größten Verjüngung herrscht ein transversales elektrostatisches Feld, das hauptsächlich von den positiv geladenen Aminosäuren Arg42, Arg82 und Arg132 an der äußeren Porenwand zusammen mit den negativ geladenen Asp113- und Glu117-Resten in der gegenüberliegenden L3 Schleife aufgespannt wird. Im Zusammenspiel mit weiteren geladenen und polaren Resten im Lumen der Pore – Lys16 ragt ebenfalls in Richtung der Verjüngung – mit zum Teil stark beeinträchtigten pK_a -Werten ergibt sich für die OmpF-Pore eine leicht ausgeprägte Selektivität für Kationen gegenüber Anionen [157,158].

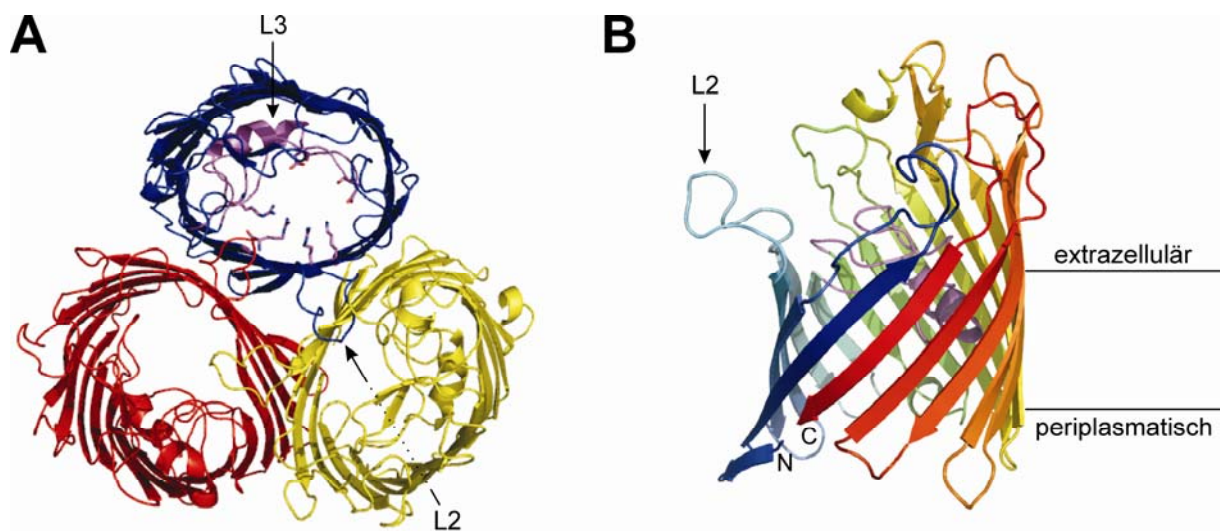


Abbildung 18: Kristallstrukturen des Porins OmpF. (A) Aufsicht auf den trimeren Kanal von der extrazellulären Seite. Jedes porenbildende Monomer wurde einzeln angefärbt. Im blauen Monomer sind die Schleife L3 sowie die als Stäbchen dargestellten Resten Arg42, Arg82, Arg132, Lys16, Asp113 und Glu117 der Konstriktionzone violett hervorgehoben. (B) Seitenansicht eines einzelnen Monomers zur Verdeutlichung der Fasstruktur aus 16 β -Faltblättern mit den Schleifen L1-L8 im extrazellulären Bereich und den Haarnadelschleifen T1-T8 am periplasmatischen Ende. Die L3 Schleife ist wieder violett eingefärbt (PDB-Datei: 2omf).

Die Ionenkanalaktivität der OmpF-Trimere konnte anhand von elektrophysiologischen Einzelkanalmessungen direkt in der Zellmembran mit Hilfe der *Patch-Clamp* Methode oder von gereinigten Kanälen nach Insertion in eine planare Lipiddoppelschicht nach dem *Black Lipid Membrane* Verfahren (Kapitel 3.4.9) bestimmt werden [159-161]. Anhand dieser Messungen wurde das Bild eines trimeren Kanals weiter gestützt. Nach der simultanen Öffnung aller drei Poren eines Trimers, wurde ein individuelles Schließverhalten der einzelnen Monomere beobachtet [162]. Die Dekremente dieser individuellen Schließereignisse lagen im Bereich von einem Drittel der Stromstärke durch ein komplett geöffnetes Trimer. Zudem wurde das Phänomen beobachtet, dass die Kanäle ein spannungsabhängiges Schließverhalten (*voltage gating*) zeigten [160]. Oberhalb einer Schwellenspannung, die je nach Bedingungen im Bereich von 100-200 mV lag, wurde die Wahrscheinlichkeit eines Schließereignisses größer als die einer Porenöffnung. Der Mechanismus dieses Schließverhaltens ist ebenso wenig geklärt wie dessen physiologische Bedeutung, da die angelegten Spannungen deutlich über natürlich vorkommenden Membranpotentialen lagen [163].

Zudem wurde das Porin OmpF bereits erfolgreich für *Protein Engineering* Studien eingesetzt. Durch Punktmutagenese ließ sich die Ladungsverteilung innerhalb der Pore so verändern, dass ein DEEE-Motiv analog zu Selektivitätsfiltern von Calciumkanälen (EEEE) installiert und eine erhöhte Selektivität für Calciumionen geschaffen werden konnte [164]. Über Disulfidbrücken mit eingeführten Cysteinresten konnten geladene Ammonium- und Sulfonatgruppen sowie das Tripeptid Glutathion in die Pore eingebracht werden. Die Volumenreduktion und veränderten Ladungsverhältnisse führten zu signifikanten Anionen bzw. Kationenselektivitäten [165,166].

Insgesamt stellt OmpF ein attraktives Protein zum Studium von Ionenkanälen dar, da sowohl seine dreidimensionale Struktur als auch seine elektrophysiologischen Eigenschaften ausführlich in der Literatur beschrieben sind. Im Zuge dieser Studien wurden Protokolle zur Extraktion des aktiven trimeren Porins aus der äußeren Membran von *E. coli* ebenso entwickelt wie zur Expression in Form von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*), zur Rückfaltung nach denaturierender Reinigung und zur elektrophysiologischen Analyse [164,167-169].

1.7 Aufgabenstellung

Gespaltene Inteine haben sich in diversen Anwendungen als nützliche Werkzeuge in der Proteinchemie erwiesen. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, rekombinant hergestellte Proteine und Proteinfragmente unter physiologischen Bedingungen und im mikromolaren Konzentrations-

bereich in einigen Beispielen sogar in lebenden Organismen zu ligieren. Ein vor der Ligation durchgeführter Modifikationsschritt sowie das semisynthetische Protein *trans*-Spleißen ermöglichen zudem die Kombination mit Biokonjugationsmethoden bzw. der Festphasen-Peptidsynthese. In diesem Kontext tragen artifiziell gespaltene Inteine aufgrund ihrer deutlich höheren Variabilität bezüglich Aufbau und Herkunft gegenüber den natürlich gespaltenen Inteinen das Potential in sich, ein weit gefächertes Anwendungsspektrum zu erschließen.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Bandbreite der Protein *trans*-Spleißreaktion mit Hilfe von künstlich gespaltenen Inteinen weiter zu vergrößern. Zum einen sollte das gespaltene *Ssp* DnaB Intein unter nativen *in vitro* Bedingungen charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Inteinfragmente mit dem FKBP/FRB-Heterodimerisierungssystem fusioniert, um den Einfluss einer forcierten Assoziation zu untersuchen. In diesem Kontext waren besonders die kinetischen Eigenschaften des *Ssp* DnaB Inteins von Interesse sowie deren Vergleich mit bereits charakterisierten gespaltenen Inteinen.

In einem zweiten Ansatz sollte die Spleißaktivität des künstlich gespaltenen *Psp*-GBD Pol Inteins unter denaturierenden Bedingungen ausgenutzt werden, um die Protein *trans*-Spleißreaktion auf das bedeutende Feld der Semisynthese von Membranproteinen auszuweiten. Zur Solubilisierung des *E. coli* Porins OmpF sind denaturierende Harnstoffkonzentrationen von 6 M notwendig, die aber von dem äußerst robusten Intein toleriert werden können. Diese Eigenschaft sollte ausgenutzt werden, um das Porin durch Ligation von zwei Fragmenten wiederherzustellen und durch Rückfaltung die trimere OmpF-Pore zu erhalten. Elektrophysiologische Funktionsstudien nach dem *Black Lipid Membrane* Verfahren sollten die Ionenkanalaktivität einzelner Poren belegen. Zur Etablierung eines semisynthetischen Ansatzes aufbauend auf einer Sequenz aus Cystein-Konjugation, Protein *trans*-Spleißen und Rückfaltung sollte ein Kronenetherderivat zur Modulation der Kanaleigenschaften im Lumen der Pore positioniert werden.

2 Material

2.1 Geräte und Apparaturen

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller mit Typenbezeichnung
Agarosegel-Apparatur	<i>PEQLAB</i> Perfect Blue Gelsystem
Analysenwaage	<i>Mettler</i> PM400
Autoklav	<i>Thermo Fischer Scientific</i> Varioklav Dampfsterilisator
BLM-Apparatur	<i>Warner Instruments</i> cuvette CP2A, bilayer chamber BCH-22A <i>Axon Instruments</i> Axopatch 200B patch-clamp amplifier, Digidata 1200B A/D converter, pClamp 9 software
CD-Spektrometer	<i>Jasco</i> J-715 Spektropolarimeter
Chromatographiesysteme	<i>GE Healthcare</i> Äkta prime plus und Äkta Purifier 10
Elektroporationssystem	<i>Bio-Rad</i> Gene Pulser und Pulse-Controller
Emulsifier	<i>Avestin</i> EmulsiFlex-C5 High pressure homogenizer
Gefrierschrank -80°C	<i>New Brunswick Scientific</i> Ultra low temperature freezer
Gefriertrocknungsanlage	<i>Christ</i> LT-105
Geldokumentationssystem	<i>Canon</i> PowerShot G5 Digitalkamera <i>H. Saur</i> Transilluminator IL-200-M (312 nm) UV-Schirm
Heizblock	<i>Eppendorf</i> ThermoStat plus
Homogenisator	<i>Wheaton</i> Tissue Grinder Potter-ELV
Inkubationsschrank	<i>Memmert</i>
Inkubationsschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> I26 <i>Infors</i> HT Aerotron
MALDI-TOF	<i>Bruker Daltonics</i> AutoFlex III
PCR-Gerät	<i>Biometra</i> Tpersonal Kombi
pH-Meter	<i>HANNA instruments</i> pH211 Microprocessor pH-Meter
Photometer	<i>Amersham Biosciences</i> Ultrospec 3100 pro
Reinstwasseranlage	<i>Millipore</i> Milli-Q
Rotationsverdampfer	<i>Heidolph</i> Laborata 4000-efficient
Rührer für Homogenisator	<i>VWR</i> VOS14 S40

Gerät	Hersteller mit Typenbezeichnung
SDS-PAGE-Apparatur	<i>BioRad</i> Mini-PROTEAN 3 Cell <i>Biorad</i> PowerPac Basic Netzgerät
Ultraschallbad	<i>Bandelin</i> Sonorex Digitec
Zentrifugen/Rotoren	<i>Eppendorf</i> Centrifuge 5424 <i>Eppendorf</i> Centrifuge 5702R <i>Sorvall</i> Evolution RC Rotoren: SS34, <i>FiberLite</i> F8 und F10

2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste der eingesetzten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.

Hersteller	Produkt
<i>Acros Organics</i> (New Jersey, USA)	Imidazol
<i>Alexis Biochemical</i> (Lörrach)	DMPC
<i>AppliChem</i> (Darmstadt)	IPTG, Ampicillin, Kanamycin, Tris, Trypton, HCl, Isopropanol, BSA
<i>Bachem</i> (Weil am Rhein)	OPOE
<i>Biosolve</i> (Valkenswaard, Niederlande)	DMF
<i>Deutsche Hefewerke</i> (Nürnberg)	Hefeextrakt
<i>Eurogentec</i> (Köln)	Agarose
<i>Fermentas</i> (St. Leon-Rot)	Restriktionsenzyme und -puffer, DTT, Protein- und DNA-Größenstandards
<i>Fluka</i> (Neu Ulm)	TCEP (für Click-Reaktion)
<i>GE Healthcare</i> (München)	ECL Westernblotting System, Ni-Sepharose 6 fastflow, HiTrap Q HP Säulen
<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe)	Topo TA Cloning Kit
<i>Macherey & Nagel</i> (Düren)	porablot NCP 0,45 µm Nitrocellulosemembran
<i>Merck</i> (Darmstadt)	SDS, Tween-20, 5-IAF, <i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
<i>Millipore</i> (Carrigtwohill, Irland)	Viva-Spin-Säulen (MWCO: 5, 10, 30 und 50 kDa), Dialysemembran (0,025 µm)
<i>Novagen</i> (Darmstadt)	KOD-Hot Start Polymerase-PCR-Kit
<i>New England Biolabs</i> (Schwalbach)	DNA-Größenstandard
<i>Operon Biotechnologies</i> (Köln)	Oligonucleotide

Hersteller	Produkt
<i>Qiagen</i> (Hilden)	QIAquick Spin Säulen, Ni ²⁺ -NTA-Superflow, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit
<i>Roche</i> (Mannheim)	Trypsin (Sequencing Grade)
<i>Roth</i> (Karlsruhe)	Acrylamid-Lsg. Rotiphorese-Gel 30, APS, Dialyseschlauch (MWCO:15 kDa), DDM Ethidiumbromid, TEMED, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau, Trypsin, Harnstoff, Triton X-100, Agar-Agar
<i>VWR</i> (Darmstadt)	BC Assay: Protein Quantitation Kit (Uptima) Vivaspin 4 Konzentratoren (MWCO: 5 kDa)
<i>Sigma-Aldrich</i> (München)	L- α -Phosphatidylcholin (P3556), L- α -Phosphatidylethanolamin (P8193), 4-Azidophenacylbromid, 4-Azidoanilin Hydrochlorid, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, TBTA, Kupfersulfat

2.3 Vektoren

2.3.1 pMAL-c2x

Der Vektor pMAL-c2x (6648 bp, Genbank: AX377531, *New England Biolabs*) diente zur Produktion von Fusionsproteinen mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) aus *E. coli*. Dessen Affinität zu Amylose-basierten Säulenmaterialien wurde zur chromatografisch Reinigung ausgenutzt. Die Expression des *malE* Gens zusammen mit der Zielgensequenz stehen unter der Kontrolle des *tac* Promoters, der bis zur Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) durch Bindung des *lac* Repressor, kodiert durch das *lacI* Gen, an den *lac* Operator blockiert wird. Das Gen der β -Lactamase, die Resistenz gegen Ampicillin verleiht, und der Replikationsursprung *ColE1* stammen beide aus dem Plasmid pBR322. Der Replikationsursprung M13 wurde pZ150 entnommen. Dieser Vektor diente zur Konstruktion der in Kapitel 3.1 beschriebenen Plasmide pHM45, pTK55 und pSB15.

2.3.2 pTrc99a

Der Vektor pTrc99a (4176 bp, Genbank: M22744, U13872, A13038) ist ein Derivat des Plasmids pKK233-2. Er besitzt einen *trc* Promotor, eine *multiple cloning site* (MCS) und die Terminatorsequenzen *rrnB* T1 und T2. Das enthaltene *lacI* Gen zur Expression des *lac*

Repressors begründet die Induzierbarkeit der Expression der Zielgensequenz mit IPTG. Zu Selektionszwecken dient eine Ampicillinresistenz. Der Replikationsursprung ColE1 stammt aus pBR322. Die Expressionsplasmide pHM41, pHM81, pTK56, pSB13, und pSB51 gehen auf diesen Vektor zurück.

2.3.3 pET-16b

Der Vektor pET-16b (5711 bp, *Novagen*) verfügt über eine *multiple cloning site* (MCS), die eine Zielgensequenz am 5'-Ende mit den Codons einer Faktor Xa Proteaseschnittstelle sowie einer Sequenz aus sechs Histidinen verbindet. Der T7 Promotor reguliert die Expression des Zielgens und wird durch den *lac* Repressor (*lacI* Gen) reprimiert, bis IPTG zur Induktion der Expression des Zielgens zugegeben wird. Die kodierte β -Lactamase verleiht Ampicillinresistenz und die Vervielfältigung geschieht über den ColE1 Replikationsursprung aus pBR322. Die Plasmide pSB24, pSB37 und pSB45 wurden mit Hilfe dieses Vektors kloniert.

2.3.4 pET-11c

Der Vektor pET-11c (5675 bp, *Novagen*) enthält einen T7-Tag zur Immunoaffinitätsreinigung des Zielprotein, das N-terminal mit dem Tag fusioniert vorliegt. Alle weiteren Angaben können der Beschreibung von pET-16b (2.3.3) entnommen werden. In dieser Arbeit wurde das Derivat pAII17 verwendet, in das vier zusätzliche *rrn_b* Sequenzen zur Transkriptionstermination eingefügt wurden [170]. Er diente als Grundlage zur Konstruktion der Plasmide pSB27, pSB28, pSB40, pSB42, pSB44 und pSB46.

2.3.5 pET-28a

Dieser Vektor (5369 bp, *Novagen*) dient zur Produktion von Fusionsproteinen, die am N-Terminus eine Hexahistidinsequenz und eine Thrombin Proteaseschnittstelle, sowie eine optionale C-terminale Hexahistidinsequenz tragen. Des Weiteren enthält der Vektor das Kanamycin-Resistenzgen, einen T7-Promotor, den *lac* Repressor (*lacI*-Gen) und den ColE1 Replikationsursprung aus pBR322. Er wurde für die Herstellung des Expressionsplasmid pJH01 eingesetzt.

2.3.6 pCR 2.1-Topo

Der Vektor pCR 2.1-Topo (3931 bp, *Invitrogen*) besteht aus linearer DNA mit 3'-T-Überhängen zur direkten Ligation von PCR-Produkten, die durch die *Taq* Polymerase amplifiziert

wurden. Beide Enden sind durch kovalente Verknüpfungen mit der Topoisomerase I aktiviert. Nach erfolgreicher Klonierung steht die Transkription der Zielgenesequenz unter der Kontrolle des T7 Promotors. Der Vektor verleiht Resistenzen gegen Ampicillin und Kanamycin. Der Replikationsursprung fl ist ebenso enthalten wie pUC.

2.4 Mikroorganismen

2.4.1 *E. coli* DH5α

Der hitzekompetente Stamm *E. coli* DH5α (Subcloning Efficiency DH5α, *Invitrogen*) wurde für Klonierungsarbeiten verwendet.

Genotyp: $F^{-}\Phi80lacZ\Delta M15\Delta(lacZYA-argF)U169\ deoR\ recA1\ endA1\ hsdR17(r_K^{-}\ m_K^{+})$
 $phoA\ supE44\ thi-1\ gyrA96\ relA1\lambda^{-}$

2.4.2 *E. coli* BL21 Gold (DE3)

Dem Expressionsstamm *E. coli* BL21 Gold (DE3) fehlen zur Erhöhung der Proteinstabilität die Proteasegene *lon* und *ompT*. Er enthält ein Gen für die T7 RNA-Polymerase, das im Chromosom nach *lacZ* und dem Promotor *lacV5* auf einem λ -Prophagen insertiert vorliegt. Diese ist nach Induktion mit IPTG für die effiziente Expression von Zielgenen essentiell, die auf eingebrachten Expressionsplasmiden unter der Kontrolle des T7 Promotors stehen. Außerdem enthält der Stamm eine Resistenz gegen Tetracyclin. Das Gen der Endonuclease I (*endA*) ist inaktiviert.

Genotyp: $F^{-}\ ompT\ hsdS_B\ (r_B^{-}\ m_B^{-})\ dcm^{+}\ Tet^{r}\ gal\ \lambda(DE3)\ endA\ Hte$

2.4.3 *E. coli* BL21 (DE3) *omp8*

Auf der Grundlage des Stamms *E. coli* BL21 (DE3) (*Novagen*) wurde zur Expression von *E. coli* Porinen der Expressionstamm *E. coli* BL21 (DE3) *omp8* konstruiert, der Defekte in den Genen *lamB*, *ompF*, *ompA* und *ompC* der hauptsächlich vorkommenden Porine trägt [171]. Aufgrund der Insertion des Tn5 Transposons besitzt der Stamm außerdem Resistenzen gegen die Antibiotika Kanamycin, Streptomycin und Bleomycin.

Genotyp: $F^{-},\ ompT\ hsdS_B\ (r_B^{-}\ m_B^{-})\ gal\ dcm\ (DE3),\ \Delta lamB\ ompF::Tn5\ \Delta ompA\ \Delta ompC$

2.4.4 *E. coli* XL10-Gold

Für die Herstellung elektrokompeter Zellen wurde der Stamm *E. coli* XL10-Gold ebenso wie zu Klonierungszwecken und zur Expression von Konstrukten, die das Phagenprotein gpD enthielten, verwendet.

Genotyp: Tet^r $\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacI^qΔM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r]

2.5 Medien

Zur Anzucht von *E. coli* Kulturen wurde autoklaviertes LB-Medium verwendet. Zur Herstellung von Festmedium zum Befüllen von Petri-Schalen wurden dem LB-Medium zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar-Agar beigemischt.

<i>LB-Medium</i>	10 g/L	Hefeextrakt
	5 g/L	NaCl
	5 g/L	Bactotrypton
		pH 7,0

Hitzeempfindliche Substanzen wie Ampillin (100 µg/ml), Kanamycin (25 µg/ml) oder Glucose (0,2 % (w/v)) wurden nach dem Autoklavieren aus sterilfiltrierten Lösungen zugesetzt.

2.6 Puffer und Lösungen

<i>Ni²⁺-NTA-Puffer</i>	50 mM	Tris/HCl pH 8
	300 mM	NaCl
<i>Amylosesäulenpuffer</i>	20 mM	Tris/HCl pH 7,4
	200 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
<i>Lysepuffer</i>	50 mM	Tris/HCl pH 7
	300 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	5 mM	DTT

<i>Waschpuffer</i>	50 mM	Tris/HCl pH 8
	300 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2 mM	DTT
	1 M	Harnstoff
	2 % (v/v)	Triton X-100
<i>Spleißpuffer</i>	50 mM	Tris/HCl pH 7
	300 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
<i>Harnstoffpuffer</i>	50 mM	Tris/HCl pH 7
	300 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	6 M	Harnstoff
<i>Phosphatpuffer</i>	50 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7,5
	150 mM	NaCl
<i>Rückfaltungpuffer</i>	20 mM	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 7,3
<i>Extraktionspuffer</i>	20 mM	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 7,3
	0,5 % (v/v)	OPOE
<i>Anionenaustausch-Puffer</i>	20 mM	Tris/HCl pH 8,3
	1 % (v/v)	OPOE
<i>BLM-Puffer</i>	5 mM	HEPES/HCl pH 7,2
	150 mM	KCl
<i>10 % SDS-PAGE-Gele</i>	29,5 ml	H ₂ O
	19 ml	Tris/HCl pH 8,8
	25 ml	30%-ige Acrylamidlösung (mit 0,8% Bisacrylamid)
	750 µl	10 % SDS
	30 µl	TEMED
	750 µl	10 % APS

<i>SDS-PAGE Laufpuffer</i>	50 mM	Tris
	250 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
<i>4 × SDS-Probenpuffer</i>	50 mM	Tris/HCl pH 6,8
	8 % (w/v)	SDS
	40 % (v/v)	Glycerin
	20 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
<i>Coomassie-Färbelösung</i>	40 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	2,5 g/l	Coomassie Brilliant Blau R 250
<i>Coomassie-Entfärbelösung</i>	40 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
<i>Waschlösung</i>	200 mM	NH ₄ HCO ₃
	50 % (v/v)	Acetonitril
<i>Trypsinlösung</i>	40 mM	NH ₄ HCO ₃ pH 8,1
	10 % (v/v)	Acetonitril
	0,02 µg/µl	Trypsin
<i>Diffusionslösung</i>	10 % (v/v)	Acetonitril
	1 %	Trifluoressigsäure
<i>Matrixlösung</i>	gesättigt	2,5-Dihydroxybenzoesäure
	30 %	Acetonitril
	0,1 %	Trifluoressigsäure

3 Methoden

3.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die angewandten molekularbiologischen Techniken orientierten sich an den bekannten Standardausführungen [172]. Plasmide wurden nach alkalischem Zellaufschluss aus *E. coli* gewonnen [173], mit Restriktionsendonucleasen verdaut, mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt [174] und mit weiteren DNA-Fragmenten ligiert, die entweder ebenfalls aus Restriktionsverdauen gewonnen oder mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit synthetischen Oligonucleotiden (*Operon*) als Primersequenzen amplifiziert wurden [175]. Hitze-kompetente *E. coli* DH5 α oder elektrokompetente *E. coli* XL-10 Gold Zellen wurden mit den rekombinanten Plasmiden transformiert und vermehrt, bevor die konstruierten Plasmide präpariert, durch Restriktionsverdau analysiert und schließlich durch Sequenzierung (*GATC Biotech*) verifiziert wurden [176]. Plasmide, PCR-Produkte und DNA-Fragmente wurden nach Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Trennung über *QIAquick* Spinsäulen (*Qiagen*) gereinigt, Punktmutationen wurden entsprechend dem *QuickChange Site-Directed Mutagenesis*-Protokoll (*Stratagene*) in Plasmid-DNA eingeführt [177].

Klonierung der Konstrukte mit den Fragmenten des gespaltenen Ssp DnaB Inteins

Die für die Hälften des *Ssp DnaB* Inteins kodierenden DNA-Fragmente, wurden durch PCR von dem als Templat dienenden Plasmid pMST erhalten, das von Xiang-Qin Liu erhalten wurde [27]. Zur Amplifikation der N-terminalen Inteinhälfte dienten die Oligonucleotide oHM114 (5'-ATAGAATTCTCCGGCTGCATCAGTGGAGATAG-3') und oHM115 (5'-AT-AAAGCTTTTATCTAGATAAAGAGGAGCTTTCTAGTTTACG-3') als Primersequenzen. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonucleasen *EcoRI* und *XbaI* verdaut und mit dem in gleicher Weise verdauten Vektor pHM41 ligiert [63]. Auf diese Weise wurde das Plasmid pSB13 zur Expression von Konstrukt 1 (MBP-*Ssp DnaB*^N-FKBP-His₆) erhalten. Zur Herstellung des C-terminalen Inteinfragments wurden die Primer oHM116 (5'-ATACCATGGGCACTAGTTCACCAGAAATAGAAAAGTTGTC-3') und oHM117 (5'-ATAGGTACCAGATCTAATACTGTTATGGACAATGATGTC-3') verwendet. Durch Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor pHM24 [62] unter Verwendung der *SpeI* und *BglIII* Schnittstellen wurde das Zwischenkonstrukt pSB14 erhalten. Aus diesem wurde das *XbaI-HindIII*-Fragment ausgeschnitten und mit dem entsprechend verdauten Vektor pHM45 ligiert [63], wodurch pSB15 erhalten wurde, das die kodierenden Sequenzen für Konstrukt 2 (MBP-FRB-*Ssp DnaB*^C-His₆) enthält. Die Expressionplasmide pTK56 und pTK55 der Konstrukte 6

(MBP-*Ssp* DnaB^N-His₆) und **7** (MBP-*Ssp* DnaB^C-His₆) wurden von Thomas Kurpiers wie in der Literatur beschrieben hergestellt [178]. Zur Herstellung des Cys-Tag-Konstrukts wurde ausgehend von pTK55 zunächst eine Mutagenese-PCR mit dem Oligonucleotid oTK15 5'-CATAACAGTATTAGATCCTGCGGTCATCACCATCACCATC-3' und dem dazugehörigen reversen Komplement (oTK16) durchgeführt, um das Plasmid pTK54 zu erhalten. Dieses wurde wiederum zur PCR mit oSB17 (5'-AATGGATCCTCTAGTTCACCAGAAATAG-3') und oSB18 (5'-ATAAAGCTTAACCGCAGGATCTAATACTGTTATGG-3') eingesetzt, deren Amplifikat mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut und mit dem entsprechend vorbehandelten Vektor pAT37 ligiert wurde, wodurch pSB34 erhalten wurde. Der Vektor pAT37 wurde von Frank Bernhard zur Verfügung gestellt [179]. Eine weitere PCR mit dem Templat pSB34 und den Primersequenzen oJZ35 (5'-ATACCATGGCCAGTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAGCGAGCAAAGAAACCTTTACCC-3') und oJZ36 (5'-ATAAAGCTTACCGCAGGATCTAATACTGTTATGG-3') lieferte ein DNA-Fragment, das mit Hilfe von *Nco*I und *Hind*III in den Vektor pET-28a kloniert wurde, wodurch pJZ35 erhalten wurde. Durch Mutagenese-PCR mit den Oligonucleotiden oSB46 (5'-GTATTAGATCCTGCGGTAACCTTGCGGCCGCACTCG-3') und oSB47 (5'-CGAGTGCGGCCGCAAGGTTACCGCAGGATCTAATAC-3') wurde schließlich das Plasmid pJH01 zur Expression von Konstrukt **41** (Strep-gpD-*Ssp* DnaB^C-Cys-Tag) erhalten, das aus einem Strep-tag II (WSHPQFEK), dem gpD-Protein des Bacteriophagen λ , der C-terminalen Inteinhälfte des *Ssp* DnaB Inteins (AS 382-429) und dem Cys-Tag, bestehend aus den Resten SCGNLAAALEHHHHHHH, zusammengesetzt ist.

Herstellung der Konstrukte des Sce VMA Inteins

Die Plasmide pHM41, pHM45 und pHM81 zur Expression der Konstrukte **11** (MBP-*Sce* VMA^N-FKBP-His₆), **12** (MBP-FRB-*Sce* VMA^C-His₆) und **11a** (MBP-*Sce* VMA^N C1A-FKBP-His₆) wurden von Henning Mootz zur Verfügung gestellt [63].

Generierung des Ausgangskonstrukts des Ckl PTerm Inteins

Die für das *Ckl* PTerm Intein kodierende DNA-Sequenz wurde mittels PCR aus einer Präparation genomischer DNA von *Clostridium kluyveri* mit den Oligonucleotiden oSB40 (5'-ATAGAATTCAGGAAAAACGGTAAAGCTTTAG-3') und oSB41 (5'-ATATCTAGAACTAATAAGGGTAGTATTATGC-3') amplifiziert. Die *Clostridium kluyveri* DNA wurde von Henning Seedorf erhalten [180]. Das PCR-Fragment wurde mit *Eco*RI und *Xba*I verdaut

und in den Vektor pSB13 kloniert, wodurch das Plasmid pSB51 zur Expression von Konstrukt **16** (MBP-*Ckl* PTerm-FKBP-His₆) erhalten wurde.

Konstruktion der Expressionsplasmide des Porins OmpF und seiner Mutanten

Das Plasmid pET-OMPf1, das die Wildtyp Gensequenz von OmpF aus *E. coli* DH5 α inklusive der Signalsequenz enthält, wurde von Simon Reitz zur Verfügung gestellt [181]. Zur Expression des nativen OmpF-Porins ohne Signalsequenz in Form von unlöslichen Einschlusskörpern (Konstrukt **26**) wurde das Plasmid pSB40 durch PCR-Amplifikation des DNA-Fragments von OmpF mit den Primersequenzen oSB22 (5'-ATAAAGCTTAGAACTGGTAAACGATACCC-3') und oSB26 (5'-ATACATATGGCAGAAATCTATAACAAAGATGG-3') sowie dem Plasmid pET-OMPf1 als Templat und anschließender Klonierung in den Vektor pI_{C3}P [52] mit Hilfe der *Nde*I und *Hind*III Schnittstellen hergestellt. Die Plasmide pSB42 und pSB46 der Cystein-Mutanten OmpF K16C (**32**) bzw. OmpF G119C (**33**) wurden ausgehend von pSB40 durch Punktmutagenese mit dem Primerpaaren oSB30 (5'-GTAGATCTGTACGGTTGCGCTGTTGGTCTGCAT-3') und oSB31 (5'-ATGCAGACCAACAGCGCAACCGTACAGATCTAC-3') bzw. oSB36 (5'-GATATGCTGCCAGAATTTTGTGGTGATACTGCATAC-3') und oSB37 (5'-GTATGCAGTATCACCACAAATTCTGGCAGCATATC-3') erhalten. Die zu mutierenden Codons sind unterstrichen.

Herstellung der Fusionskonstrukte des Psp-GBD Pol Inteins und der OmpF-Fragmente

Zur Konstruktion der Fusionsproteine mit den Fragmenten des gespaltenen *Psp*-GBD Pol Inteins wurde die Sequenz der N-terminalen Inteinhälfte (Codons der AS 1-440, wobei pMI_{N3} eine L195F Substitution enthielt) mit Hilfe einer PCR vom Templat-Plasmid pMI_{N3} [52] mit den Oligonucleotiden oSB24 (5'-ATAGAATTCATGCGTTTTTCCTTTGAC-3') und oSB25 (5'-ATAGGATCCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTCTGTATTCCGTAAACTTAAGTTCC-3') amplifiziert und dabei gleichzeitig eine C-terminale Hexahistidinsequenz (His₆) eingeführt. Das PCR-Produkt wurde entsprechend den Herstellerangaben in den Vektor pCR 2.1-Topo kloniert (*Invitrogen*, Topo TA Cloning Kit), mit *Eco*RI und *Bam*HI ausgeschnitten und mit dem gleichermaßen verdauten Vektor pMI_{N3} ligiert, wodurch pSB26 erhalten wurde. Das DNA-Fragment des C-terminalen Inteinfragments (AS 441-537) wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Nde*I und *Hind*III aus dem Vektor pI_{C3}P ausgeschnitten und mit dem Vektor pET16b ligiert, so dass sich im Zielplasmid pSB23 am 5'-Ende der Inteinsequenz *in frame* die Codons einer His₁₀-Sequenz anschlossen. Das Plasmide pI_{C3}P sowie pMI_{N3} wurden von Maurice Southworth erhalten [52].

Die DNA-Sequenzen der OmpF-Fragmente wurden jeweils vom Templat pET-OMPF1 mittels PCR erhalten. Mit den Oligonucleotiden oSB26 (5'-ATACATATGGCAGAAATCTATAACAAAGATGG-3') und oSB27 (5'-ATAGGTACCCATTCTTCCGGTAAAA-TGCTGTTTTACCGTTACCCTTGG-3') wurde die kodierende Sequenz des N-terminalen Fragments OmpF(AS 1-30) erhalten, während eine PCR mit oSB26 und oSB28 (5'-ATAGGTACCCATTCTTCCGGTAAAATGCTAGCCTCGAGACCCTTGGAAAAATAATGC-AGACC-3') das Fragment OmpF(AS 1-26)-LEA ergab. Beide PCR-Produkte wurden mit Hilfe von *NdeI* und *KpnI* in den Vektor pSB27 kloniert, wodurch die Expressionsplasmide pSB28 des Konstrukts **19** (OmpF(1-30)-*Psp* Pol^N-His₆) und pSB28 für Konstrukt **21** (OmpF(1-26)-LEA-*Psp* Pol^N-His₆) erhalten wurden. Die DNA-Sequenz des C-terminalen Fragments OmpF(31-340) wurde von den Primern oSB22 (5'-ATAAAGCTTAGAACTGTAAACGATACCC-3') und oSB21 (5'-ATAGGATCCCTCTATGCACATAATAGTTACGGTGGCAATGGCGAC-3') begrenzt, während der Ersatz des letzten Primers gegen oSB23 (5'-ATAGGATCCCTCTATGCACATAATTCAGGCCTCAACGGTGAAAACAGTTACGGTGG-3') zur Amplifikation von SGL-OmpF(27-340) führte. Die Amplifikate wurden mit *BamHI* und *HindIII* verdaut und mit dem entsprechend vorbehandelten Vektor pSB23 ligiert, wodurch die Plasmide pSB24 zur Expression von **20** (His₁₀-*Psp* Pol^C-OmpF(31-340)) und pSB37 von Konstrukt **22** (His₁₀-*Psp* Pol^C-SGL-OmpF(27-340)) erhalten wurden.

Ausgehend von pSB28 wurde mittels Punktmutagenese mit den Primern oSB34 (5'-CATCTTTGAGAGCCTTGCTGGGACTTTGGCAGAAAAC-3') und oSB35 (5'-GTTTTCTGCCAAAGTCCCAGCAAGGCTCTCAAAGATG-3') zunächst das Codon des Cysteins an Position 351 der N-terminalen Inteinhälfte *Psp* Pol^N durch das eines Alanins ersetzt, woraus das Plasmid pSB43 hervorging. In einem zweiten Mutageneseschritt mit diesem als Templat-DNA sowie den Sequenzen oSB30 (5'-GTAGATCTGTACGGTTGCGCTGTTGGTCTGCAT-3') und oSB31 (5'-ATGCAGACCAACAGCGCAACCGTACAGATCTAC-3') als Primer wurde ein Cystein-Codon anstelle von dessen von Lys16 in das N-terminale OmpF-Fragment eingeführt, womit das Expressionsplasmid pSB44 von Konstrukt **29** (OmpF(1-26) K16C-LEA- *Psp* Pol^N-His₆) erhalten wurde. Durch Mutagenese-PCR mit dem Templat pSB37 und den Oligonucleotiden oSB36 (5'-GATATGCTGCCAGAATTTTGTGGTGATCTGCATAC-3') und oSB37 (5'-GTATGCAGTATCACCACAAAATTCTGGCAGCATATC-3') wurde das Plasmid pSB45 zur Expression von **34** (His₁₀-*Psp* Pol^C-SGL-OmpF(27-340) G119C) konstruiert.

3.2 Expression und Proteinreinigung

3.2.1 Heterologe Expression in *E. coli* Zellen

Zur Expression der Konstrukte **1, 2, 6, 7, 11, 12** und **16** wurden *E. coli* BL21 Gold (DE3) Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 0,2 % (w/v) Glucose bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,7$ bei 37 °C unter Schütteln bei 250 upm kultiviert. Das Antibiotikum diente zur Selektion transformierter Zellen, während Glucose die Produktion von Amylase unterdrückte. Zur Expression von **41** wurden ebenfalls *E. coli* BL21 Gold (DE3) Zellen transformiert, aber die Kultivierung geschah in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin. Konstrukt **16** wurde zusätzlich in *E. coli* Rosetta (DE3) Zellen durch heterologe Expression hergestellt. Nach dem Absenken der Temperatur auf 30 °C wurde die Überexpression durch Zugabe von 0,2 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert, das durch Bindung an den *lac* Repressor zur Aktivierung der starken Promotoren führte, unter deren Kontrolle die Transkription der Zielgene standen. Die Zellen wurden nach 3-4 h durch Zentrifugation (13.000×g, 15 min, 4 °C) geerntet, in Ni^{2+} -NTA-Puffer resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

Die Expressionplasmide der Konstrukte **19, 20, 21, 22, 26, 29, 32, 33** und **34** wurden benutzt, um Porin-defiziente *E. coli* BL21 (DE3) omp8 Zellen zu transformieren [171]. Nach vollständiger Expression bei 37 °C wurden die geernteten Zellen in Lysepuffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Zellaufschluss

Die resuspendierten Zellen wurden mit Hilfe eines Hochdruck-Homogenisators (EmulsiFlex-C5, *Avestin*) in zwei Läufen aufgeschlossen, wobei auf die Zellen so große Scherkräfte durch den aufgebauten Druckunterschied wirkten, dass sie dadurch zerstört wurden. Anschließend wurden Zelltrümmer, unlösliche Zellbestandteile und Einschlusskörper vom löslichen Lysat durch Zentrifugation (40.000×g, 4 °C, 30 min) abgetrennt. War das Zielprotein Teil der klaren löslichen Fraktion, wurde diese mit 5 mM Imidazol versetzt und zur affinitätschromatographischen Reinigung eingesetzt. Bei Bildung unlöslicher Einschlusskörper (**19, 20, 21, 22, 26, 29, 32, 33** und **34**) wurde der Überstand dagegen verworfen und das Protein aus dem braunen Pellet gereinigt.

3.2.3 Reinigung löslicher Proteine

Die Reinigung der im Zelllysate enthaltenen Proteine wurde affinitätschromatographisch im *Batch*-Verfahren durchgeführt. Dabei wurde ausgenutzt, dass alle Konstrukte sowohl eine Hexahistidinsequenz zur Anwendung der Ni^{2+} -NTA-Chromatographie als auch das Maltose-bindende Protein MBP zur Reinigung über Amylose-Säulenmaterial enthielten. Zunächst wurde das klare Lysat auf eine Ni^{2+} -NTA-Säule aufgetragen, die vorher mit zehn Säulenvolumen Ni^{2+} -NTA-Puffer mit 5 mM Imidazol äquilibriert wurde. Ein Säulenvolumen von 1 ml hatte ein Bindungsvermögen von etwa 20 mg Protein. Im Anschluss wurde mit 15 Säulenvolumen desselben Puffers, mit fünf Säulenvolumen Ni^{2+} -NTA-Puffer mit 20 mM Imidazol und danach noch mit 40 mM Imidazol enthaltendem Puffer gewaschen. Zur Elution diente Ni^{2+} -NTA-Puffer mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM. Vor dem nächsten Reinigungsschritt wurden der Puffer der vereinigten Fraktion mittels dreifacher Dialyse gegen das 100-fache Volumen Amylosesäulenpuffer ausgetauscht. In einer Säule wurde das Amylosesäulenmaterial mit zehn Säulenvolumen Amylosesäulenpuffer äquilibriert und mit der Proteinlösung beladen. Nach dem Waschen mit weiteren 15 Säulenvolumen wurde zur Elution Amylosesäulenpuffer mit 10 mM Maltose verwendet. Zum Abschluss wurde das Eluat in drei Schritten gegen das 100-fache Volumen Spleißpuffer dialysiert, wobei immer frisch 2 mM DTT und im letzten Schritt zusätzlich 10 % Glycerin zum Spleißpuffer hinzugefügt wurden. Die gereinigten Proteinlösungen wurden in Aliquots mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe von berechneten Extinktionskoeffizienten photometrisch durch Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die Koeffizienten wurden mit Hilfe der *Protean* Software (*DNASTAR Lasergene*) aus der Aminosäuresequenz berechnet. Es wurden 2-20 mg Protein pro Liter Expressionskultur erhalten.

Konstrukt **41** wurde nur über die enthaltene Hexahistidinsequenz gereinigt und gegen Phosphatpuffer dialysiert. Die Expression von Konstrukt **16** lieferte das Vorläuferprotein mit integriertem *Ckl* PTerm Intein, das wahrscheinlich direkt im Anschluss an die ribosomale Protein-Biosynthese die Protein-Spleißreaktion vermittelte und das Spleißprodukt **17**, das wie das Vorläuferprotein eine Hexahistidinsequenz besaß, sowie das ausgeschnittene Intein **18** hervorbrachte. Das entsprechende Zelllysate (5 ml) wurde deshalb auf etwa 500 μl Ni^{2+} -NTA-Chromatographiematerial gegeben, das vorher mit Ni^{2+} -NTA-Puffer gewaschen und durch Zentrifugation (500 \times g, 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pelletiert wurde. Nach dem Schwenken für 1 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde das Chromatographiematerial erneut pelletiert und mit 5 ml Ni^{2+} -NTA-Puffer vorsichtig gewaschen. Das pelletierte Material wurde anschließend vom Überstand befreit und

mit 500 µl Ni²⁺-NTA-Puffer mit 250 mM Imidazol versetzt. Der Überstand wurde schließlich gelelektrophoretisch analysiert.

3.2.4 Reinigung von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*)

Der unlösliche Teil der aufgeschlossenen Zellen enthielt neben den zu reinigenden Einschlusskörpern noch weitere unlösliche Proteine, Teile von Zellmembranen sowie weitere Zelltrümmer. Zur Beseitigung der Kontaminationen wurde das Pellet in Waschpuffer, der das Detergenz Triton X-100 und Harnstoff mit einer Konzentration von 1 M enthielt, fünfmal homogenisiert und durch Zentrifugation (40.000×g, 4 °C, 10 min) von den in Lösung übergegangenen Bestandteilen abgetrennt. Dabei kamen Homogenisatoren nach Potter-Elvehjem zum Einsatz, deren Pistille an einen Rührer angeschlossen waren. In einem abschließenden Waschschrift wurde Waschpuffer ohne Detergenz, Harnstoff und Reduktionsmittel verwendet. Die weißen Einschlusskörper wurden bei 4 °C gelagert.

3.3 Kinetische Analyse der Protein *trans*-Spleißreaktion

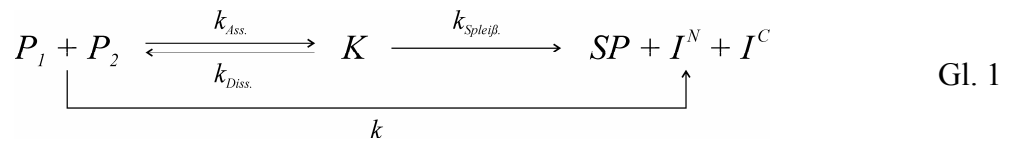
3.3.1 Durchführung der Protein *trans*-Spleißreaktion

Zur Analyse der Reaktionskinetik der Protein *trans*-Spleißreaktion der gespaltenen *Ssp* DnaB und *Sce* VMA Inteine wurden die Reaktionspartner mit einer Konzentration von 2 µM in Spleißpuffer gemischt und bei 25 °C inkubiert. Jedem Reaktionsansatz wurden 2 mM DTT aus einer frisch angesetzten Lösung zugesetzt. Zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 10, 20, 40, 60 und 120 min wurden je 30 µl des Reaktionsansatzes mit 10 µl 4x SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Analyse erfolgte über 10 %-ige SDS-PAGE Gele und anschließende Coomassie-Färbung. Mit Hilfe des Programms *Scion Image* (www.scioncorp.com) wurden die Intensitäten der Proteinbanden densitometrisch bestimmt. Mit Hilfe dieser Daten wurden die Abnahme der Ausgangskonstrukte sowie die Zunahme der Reaktionsprodukte bestimmt und zueinander in Beziehung gesetzt, wobei die Bandenintensitäten auf die Proteingrößen normiert wurden. Auf diese Weise wurde zu jedem Zeitpunkt der prozentuale Reaktionsumsatz bestimmt. Alle Messreihen waren das Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

3.3.2 Auswertung der kinetischen Daten

Zur kinetischen Auswertung der erhaltenen Reaktionsprofile und Bestimmung der dazugehörigen Geschwindigkeitskonstanten waren einige vereinfachende Annahmen notwendig, die so oder in ähnlicher Form auch in anderen Studien zur Anwendung kamen. Aus

kinetischen Untersuchungen der Protein *trans*-Spleißreaktion des natürlich vorkommenden *Ssp* DnaE Inteins [46,182] war bereits bekannt, dass sich die Gesamtreaktion aus mindestens zwei Schritten zusammensetzt, die nach Gl. 1 beschrieben werden können. Im Verlauf der Reaktion bilden zunächst die Ausgangsproteine P_1 und P_2 in einem reversiblen Assoziationsschritt mit der Geschwindigkeitskonstante k_{Ass} den spleißaktiven Komplex K . Dieser bildet dann in einer als unimolekular angenommenen irreversiblen Reaktion mit der Geschwindigkeitskonstante $k_{Spleiß}$, die alle Schritte des Spleißmechanismus sowie potentielle Faltungs- und Umorientierungsprozesse der Inteinstruktur zusammenfasst, das Spleißprodukt SP und die freigesetzten Inteinhälften I^N und I^C . Der Gesamtprozess wird durch die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k beschrieben. Bisherige kinetische Daten belegen, dass die Assoziation der Inteinfragmente sehr schnell verläuft, während die Dissoziation des Komplexes K deutlich langsamer erfolgt ($k_{Ass} > k_{Diss}$), so dass eine relativ kleine Dissoziationskonstante (36 nM für das *Ssp* DnaE Intein) resultiert. Die langsam verlaufende unimolekulare Spleißreaktion stellt vermutlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar ($k_{Ass} \gg k_{Spleiß}$) [46,182,183].



Unter Berücksichtigung der genannten Voraussetzungen kann nun angenommen werden, dass bei Bedingungen vor Erreichen eines Fließgleichgewichts (*pre-steady-state*) die äquimolar vorliegenden Ausgangsproteine P_1 und P_2 aufgrund der großen Geschwindigkeitskonstante k_{Ass} zu Beginn der Reaktion nahezu vollständig zum Inteinkomplex K assoziieren. Die langsam verlaufende Dissoziation kann im Vergleich dazu vernachlässigt werden. Für die Spleißreaktion ergibt sich demnach das Geschwindigkeitsgesetz aus Gl. 2, das erster Ordnung bezüglich der Konzentration des Inteinkomplexes K ist.

$$v = -\frac{d[K]}{dt} = k_{Spleiß} \cdot [K] = \frac{d[SP]}{dt} \quad \text{Gl. 2}$$

Darin bezeichnet v die Reaktionsgeschwindigkeit, $[K]$ die Konzentration des Komplexes K und $-d[K]/dt$ die zeitliche Abnahme derselben, während $d[SP]/dt$ die zeitabhängige Spleißproduktbildung beschreibt. Daraus ergibt sich das integrierte Geschwindigkeitsgesetz aus Gl. 3.

$$[K] = [K]_0 \cdot e^{-k_{Spleiß} \cdot t} \quad \text{Gl. 3}$$

Dabei steht $[K]_0$ für die im anfänglichen Assoziationsschritt gebildete maximale Konzentration des spleißkompetenten Inteinkomplexes. Diese kann wie weiter unten beschrieben jedoch

nicht mit der Anfangskonzentration $[P]_0 = [P_1]_0 = [P_2]_0$ der Ausgangskonstrukte P_1 und P_2 gleichgesetzt werden. Da die Dissoziation des Inteincomplexes vernachlässigt werden soll, muss zu jedem Zeitpunkt $[K] = [K]_0 - [SP]$ gelten. Durch Einsetzen und Umformen erhält man Gl. 4, die die Bildung des Spleißprodukts in Form einer Sättigungsfunktion beschreibt.

$$[SP] = [K]_0 \cdot (1 - e^{-k_{\text{Spleiß}} \cdot t}) \quad \text{Gl. 4}$$

Die in Kapitel 3.3.1 beschriebene densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten ergab die prozentuale Spleißproduktbildung SP bezogen auf die Anfangskonzentration der Ausgangskonstrukte $[P]_0$. Um dies in der kinetischen Auswertung zu berücksichtigen, muss Gl. 4 durch $[P]_0$ dividiert und mit dem Faktor 100 multipliziert werden, um in Gl. 5 ebenfalls prozentuale Angaben zu erhalten.

$$SP = P_{\text{aktiv}} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) + SP_0 \quad \text{Gl. 5}$$

Zusätzlich wurde dabei berücksichtigt, dass in den durchgeführten Untersuchungen beobachtet wurde, dass nur ein begrenzter Anteil der Ausgangskonstrukte P_{aktiv} in der Lage war, den spleißkompetenten Inteincomplex zu bilden. Dieser prozentuale Anteil P_{aktiv} entsprach der maximalen Spleißausbeute, die aus dem asymptotischen Verhalten der Sättigungsfunktion bei langen Reaktionszeiten erhalten wurde [182,184]. Des Weiteren kann aufgrund des geschwindigkeitsbestimmenden Charakters der Spleißreaktion die Konstante $k_{\text{Spleiß}}$ durch die Geschwindigkeitskonstante k der Gesamtreaktion ersetzt werden $k_{\text{Spleiß}} \approx k$. Durch Vernachlässigung des schnellen Assoziationsschritts wird demnach der Gesamtprozess vereinfachend als unimolekularer Vorgang beschrieben. Um praktische Ungenauigkeiten beim Reaktionsstart zu berücksichtigen, die sich aufgrund des anfänglich rapiden Verlaufs deutlich auf die Auswertungen auswirkten, wurde der Term SP_0 hinzugefügt. Dieser gibt an, wie viel Spleißprodukt (in %) theoretisch zum Zeitpunkt $t = 0$ bereits gebildet wurde. Diese Gleichung einer exponentiellen Sättigung wurde für die nicht-lineare Kurvenanpassung der Daten verwendet, die den zeitabhängigen Verlauf der Spleißproduktbildung darstellten, wodurch die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k erhalten wurde, die formal zunächst erster Ordnung war. Aus dem asymptotischen Verhalten für lange Reaktionszeiten wurde die maximale Spleißausbeute P_{aktiv} abgeleitet. Die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Reaktionen ließen sich nach Gl. 6 berechnen.

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Gl. 6}$$

Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 19 eine beispielhafte Auswertung aufgeführt. Dabei gab das Bestimmtheitsmaß R^2 die Güte der Regression an. Um die tatsächliche Ordnung der

beobachteten Geschwindigkeitskonstante k zu bestimmen, müsste deren Abhängigkeit von den Reaktantenkonzentrationen $[P_1]$ und $[P_2]$ detailliert untersucht werden. Besteht keine Abhängigkeit, so wäre sie erster Ordnung. Ein linearer Zusammenhang würde dagegen eine bimolekulare Reaktion belegen.

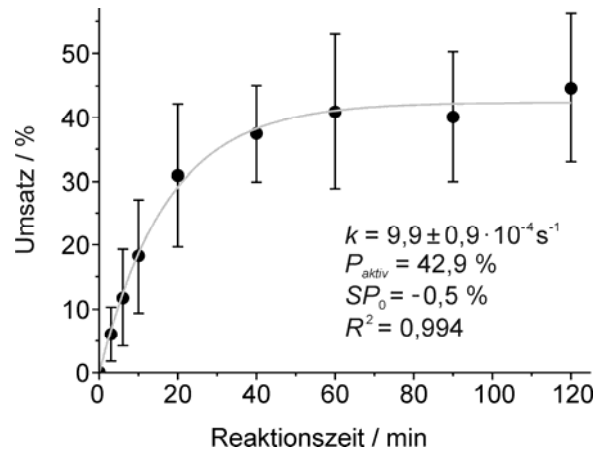


Abbildung 19: Exemplarische Auswertung der kinetischen Daten einer Protein *trans*-Spleißreaktion. Durch Regression mit Hilfe der einfach exponentiellen Sättigungsfunktion von Gl. 5 ließen sich folgende Parameter ablesen: die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion k , die formal erster Ordnung war, die maximale Spleißausbeute (Amplitude) P_{aktiv} , die Spleißproduktbildung SP_0 zum Zeitpunkt $t = 0$ und das Bestimmtheitsmaß R^2 . P_{aktiv} bezeichnet gleichzeitig den prozentualen Anteilen spleißkompetenter Ausgangskonstrukte. Negative Werte für SP_0 haben keine praktische Bedeutung, sondern beschreiben theoretisch einen verfrühten Start der Zeitmessung.

Für den Fall, dass sich mit diesem Modell keine gute Anpassung an die experimentellen Daten erreichen ließ, wurde zusätzlich eine Regression mit Hilfe einer doppelt exponentiellen Sättigungsfunktion durchgeführt, die einen Reaktionsverlauf in zwei Phasen beschreibt.

$$SP = A_1 \cdot (1 - e^{-k_1 t}) + A_2 \cdot (1 - e^{-k_2 t}) + SP_0 \quad \text{Gl. 7}$$

Aus Gl. 7 wurden die Amplitude A_1 und die Geschwindigkeitskonstante k_1 der ersten Phase sowie die Werte A_2 und k_2 der zweiten Phase erhalten. Beide Konstanten sind formal erster Ordnung. Die praktisch vorliegenden Reaktionsordnungen müssten aber wie oben erwähnt über die Abhängigkeit der Konstanten von den Eduktkonzentrationen bestimmt werden.

3.3.3 Massenspektrometrische Analyse der Protein-Spleißreaktionen

Die berechneten Massen der Ausgangskonstrukte und Reaktionsprodukte der Protein *trans*-Spleißreaktion des *Ssp* DnaB Inteins wurden von Dr. Uwe Linne verifiziert. Dazu wurden die Proteinlösungen (100 µl) mit Hilfe eines 1100 HPLC-Systems unter Verwendung einer 2.1 x 50 mm Zorbax 300SB-C8 Säule (*Agilent*) entsalzt und anschließend die Proteinmassen durch

ESI-MS mit einem QStar Pulsar i *Time-Of-Flight* Massenspektrometer (*Applied Biosystems*) bestimmt.

3.4 Präparation und Analyse der trimeren OmpF-Pore

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode

Diese Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen, die im Unterschied zu anderen colorimetrischen Verfahren mit verschiedenen Detergenzien sowie Harnstoff bis zu einer Konzentration von 6 M kompatibel ist, beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen durch vorhandene Peptidbindungen in alkalischer Lösung zu Cu^+ (Biuretreaktion), das anschließend mit Bicinchoninsäure (BCA) einen intensiv violetten Komplex bildet (Abbildung 20). Die Komplexbildung kann anhand der Absorption bei 562 nm quantifiziert werden. Durch den Vergleich mit einer vorher aufgenommenen Kalibrationsgerade mit BSA-Standardlösungen konnte aus den Absorptionwerten die Proteinkonzentration berechnet werden. Entsprechend den Herstellerangaben wurde die Kalibration in einem Konzentrationsbereich von 0,02-2 mg/ml durchgeführt. Dazu wurde zuerst eine BCA Lösung mit einer CuSO_4 Lösung im Volumenverhältnis 50:1 gemischt. Danach wurden die Proben oder Standardlösungen im Verhältnis 20:1 hinzugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Absorptionsmessungen durchgeführt wurden. Die genauen Zusammensetzungen der Reaktionslösungen wurden vom Hersteller nicht angegeben.

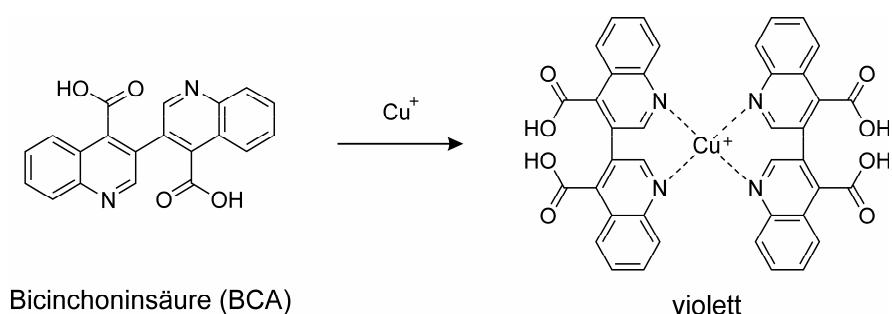


Abbildung 20: Grundlegende Reaktion der BCA-Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.

3.4.2 Modifikation der Cystein-Mutanten von OmpF

Die Einschlusskörper der zu modifizierenden Proteine (**29**, **32**, **33**, **34**) wurden in Harnstoffpuffer mit pH 7 gelöst (40-200 μM) und 15 min bei Raumtemperatur mit 5 eq. Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) reduziert. Nach Zugabe von 20 eq. Fluorescein-5-iodacetamid (5-IAF, *Merck*), Kronenether-Iodacetamid-Baustein **30** oder den eine Alkin- bzw. Azidgruppe enthaltenden Reagenzien **36** und **37** (*Sigma-Aldrich*) wurde nach einer Reaktions-

zeit von 10 min bei Raumtemperatur der pH-Wert kontrolliert und falls notwendig korrigiert. Die Reagenzien **30** und **36** wurden von Menekse Cebi synthetisiert und zur Verfügung gestellt [185,186] (siehe Anhang A3). Die Vorrats- und Reaktionsgefäße der Iodacetamid-Reagenzien wurden zum Schutz vor Licht mit Aluminiumfolie umwickelt. Nach 2 h Reaktionszeit wurde die Reaktion mit 5 eq. Dithiothreitol (DTT) in Bezug auf die Iodacetamid-Reagenzien gequencht und alle niedermolekularen Substanzen durch dreifache Dialyse gegen das 100-fache Volumen Harnstoffpuffer entfernt. Die Reaktionen von Fluorescein-5-iodacetamid wurden zusätzlich durch SDS-PAGE und Dokumentation der fluoreszierenden Gelbanden unter UV-Licht analysiert. Die Konjugationsreaktion des Cys-Tag-Konstrukts **41** (50 μ M) mit Reagenz **36** wurde in analoger Weise aber in Phosphatpuffer durchgeführt.

3.4.3 Durchführung der 1,3-dipolaren Cycloaddition

Die Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition (Click-Reaktion) zwischen einem Azid und einem terminalen Alkin läuft in der durch Cu(I)-Ionen katalysierten Variante sehr schnell und mit hohen Ausbeuten in wässriger Lösung und bei Raumtemperatur ab. Als Reaktionsprodukt entsteht das 1,2,3-Triazol ausschließlich als 1,4-disubstituiertes Regioisomer. Die katalytisch wirksamen Cu(I)-Ionen können dabei entweder direkt in Form von CuBr hinzugegeben oder *in situ* durch Reduktion von CuSO₄ durch TCEP generiert werden. In jedem Fall wird wie in Abbildung 21 dargestellt der unterstützende Effekt von produktähnlichen Liganden wie Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA) zur Stabilisierung der oxidationsempfindlichen Cu(I)-Spezies ausgenutzt [187]. Der vereinfacht dargestellte Katalysezyklus beginnt zunächst mit der Aktivierung des terminalen Alkins durch das komplexierte Cu(I) als Kupferacetylid [107]. Dabei wird angenommen, dass komplexere Strukturen mit mehreren Cu(I)-Ionen an der Aktivierung beteiligt sind [188]. Das elektrophile Cu(I) leitet anschließend den Angriff der dipolaren Azidgruppe in Richtung der ausschließlichen Bildung des 1,4-disubstituierten Triazols. Im Verlauf dieses Reaktionsschritts wird das Auftreten eines sechsgliedrigen Intermediats unter Beteiligung des Cu-Atoms postuliert, das durch Ringkontraktion das metallierte Triazol bildet. Daraus werden schließlich durch Protonierung das Additionsprodukt und der unveränderte Katalysator freigesetzt.

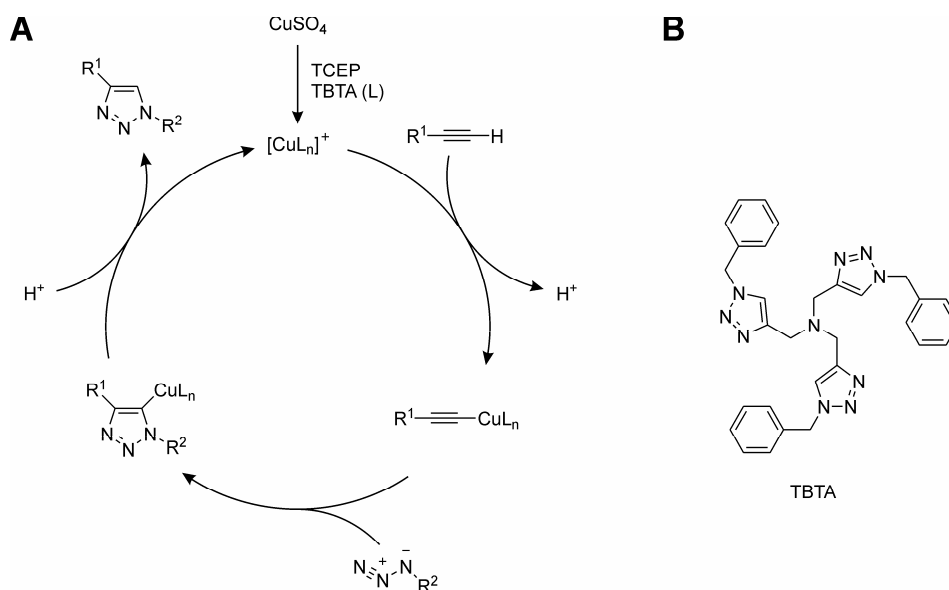


Abbildung 21: Die Kupfer-katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition. (A) Katalysezyklus der Click-Reaktion. (B) Der Triazol-Ligand TBTA stabilisiert Cu(I)-Ionen in Lösung.

Zur Vorbereitung der Click-Reaktion wurde zunächst von TBTA eine fünfzigfache Stammlösung angesetzt, indem 8,85 mg TBTA in 200 μ l DMSO gelöst wurden. Davon wurden 20 μ l mit 180 μ l DMSO und 800 μ l *tert*-Butanol gemischt, so dass eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 1,7 mM erhalten wurde. Von TCEP (*Fluka*) und $CuSO_4$ wurden jeweils 50 mM Stammlösungen in Wasser angesetzt, wobei die TCEP-Lösung mit NaOH auf pH 7 eingestellt werden musste. Vom Dansylalkin-Reagenz **39** wurde eine 30 mM Stammlösung in DMF hergestellt. Eine Lösung von Rhodaminazid **38** (32,5 mM in DMSO) wurde von Stephan Sieber (LMU München) zur Verfügung gestellt [189], während **39** von Menekse Cebi synthetisiert wurde [185] (siehe Anhang A3).

Zur Durchführung der Click-Reaktion wurden 45 μ l der Konjugate **33- \equiv** und **34-N₃** (20-100 μ M in Harnstoffpuffer), die aus den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Konjugationsreaktionen von **33** mit **36** bzw. **34** mit **37** hervorgegangen sind, mit 1 μ l Rhodaminazid **38** (650 μ M) bzw. Dansylalkin **39** (600 μ M) versetzt, je 1 μ l TCEP (1 mM) hinzugegeben und 3 s vortexiert. Direkt im Anschluss wurden 3 μ l TBTA (100 μ M) und 1 μ l $CuSO_4$ (1 mM) hinzugefügt und wieder 3 s vortexiert. Die Reaktion wurde 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert, wobei die SDS-Gele vor der Anfärbung zunächst unter Bestrahlung mit UV-Licht fotografiert wurden. Alle Reaktions- und Vorratsbehälter wurden zum Schutz vor Licht mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Reaktion des zuvor mit **36** konjugierten Cys-Tag-Konstrukts **41- \equiv** (40 μ M) mit Azidoanilin **40** (*Sigma-Aldrich*) wurde ebenso durchgeführt, wobei das Protein in Phosphatpuffer gelöst vorlag.

3.4.4 Protein *trans*-Spleißen in Anwesenheit von 6 M Harnstoff

Zur Herstellung der frisch angesetzten Proteinlösungen der Konstrukte **19**, **20**, **21**, **22**, **29** und **34** wurden die Einschlusskörper in Harnstoffpuffer resuspendiert und über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurden die Proteinkonzentrationen nach der BCA-Methode bestimmt. Außerdem wurden die Konzentrationen direkt über die Intensitäten der Proteinbanden nach SDS-PAGE abgeschätzt. Die Reaktionspartner wurden bei 4 °C so gemischt, dass beide Reaktionspartner in gleichen Konzentrationen vorlagen. Wegen der limitierten Löslichkeit der N-terminalen Konstrukte ergab sich eine Reaktantenkonzentration von etwa 40 µM. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, bevor die Protein-Spleißreaktion durch Erhöhen der Reaktionstemperatur auf 37 °C gestartet wurde. Die Protein-Spleißreaktionen wurden über Nacht durchgeführt, in deren Verlauf ein geringer Teil der Proteine präzipitierte und durch Zentrifugation (3.000×g, 15 min, 4 °C) abgetrennt wurde.

3.4.5 Reinigung der OmpF-Spleißprodukte

Die als Spleißprodukte aus der Protein-Spleißreaktion hervorgegangenen ligierten OmpF-Fragmente wurden durch Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie von unreaktierten Ausgangskonstrukten und den ebenfalls als Reaktionsprodukte entstehenden Inteinhälften abgetrennt. Für die „negative“ Reinigung wurde ausgenutzt, dass alle enthaltenen Proteine mit Ausnahme der OmpF-Spleißprodukte eine Histidinsequenz enthielten, über die sie an das Ni²⁺-NTA-Säulenmaterial binden konnten. Zur Vorbereitung des Säulenmaterials wurde es zweimal mit dem zehnfachen Volumen Harnstoffpuffer gewaschen und durch Zentrifugation (500×g, 20 min, 4 °C) pelletiert. Der überstehende Puffer wurde jeweils vorsichtig abgenommen und verworfen. Der Reaktionsansatz der Protein-Spleißreaktion wurde auf pH 8,0 eingestellt, auf das Säulenmaterial gegeben und eine Stunde bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach Zentrifugation (500×g, 20 min, 4 °C) wurde die überstehende Proteinlösung vorsichtig abgenommen und in eine Konzentratoreinheit (Vivaspin 4, MWCO 5 kDa) gegeben. Durch Zentrifugation (3.000×g, 1-2 h, 4 °C) wurde die Proteinlösung auf 1/10 des Volumens eingengt und direkt zur Rückfaltung eingesetzt.

3.4.6 Rückfaltung der trimeren OmpF-Struktur

Die zur Rückfaltung benutzten gemischten unilamellaren Lipidvesikel, die zu gleichen molaren Anteilen (7,4 mM) das Lipid 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) und das Detergens Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) enthielten, wurden nach einem etablierten

Rückfaltungsprotokoll von Surrey und Jähnig präpariert [168,190]. Dazu wurden 10 mg DMPC in 200 μ l CHCl_3 in einem Kolben gelöst. Das Lösungsmittel wurde bei 35 °C und 300 mbar am Rotationsverdampfer abgezogen und der milchig trübe DMPC-Film 1 h bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet. Nach Zugabe von 2 ml Rückfaltungspuffer (20 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,3) wurden die Vesikel durch Inkubation für 30 min bei 30 °C im Ultraschallbad gebildet. Dabei musste regelmäßig die Temperatur kontrolliert werden. Anschließend wurde die Vesikelsuspension über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 7,6 mg DDM wurde der Einbau in die Vesikel durch Inkubation für 10 min bei 30 °C im Ultraschallbad ermöglicht. Nach Schütteln der Vesikel bei 30 °C über Nacht wurden die Lösungen der gereinigten Spleißprodukte unter Rühren zur Vesikelsuspension langsam hinzugegeben, so dass die Proteinlösungen 1:5 oder 1:10 verdünnt wurden. Dabei präzipitierte ein großer Teil der nicht rückfaltbaren Proteine aufgrund der herabgesetzten Harnstoffkonzentration. Die Rückfaltungsansätze wurden erneut bei 30 °C über Nacht geschüttelt. Schließlich ließ man das Präzipitat bei 4 °C über mehrere Tage sedimentieren. Der Erfolg der Rückfaltung wurde durch SDS-PAGE mit 12 %-igen Gelen überprüft, indem zwei Probe des Rückfaltungsansatzes direkt nebeneinander analysiert wurden, wovon eine zuvor durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert wurde. Das OmpF-Trimer war unter den Bedingungen der SDS-PAGE stabil und führt zu einer Proteinbande im Größenbereich von 111 kDa, die in der hitzedenaturierten Probe nicht mehr vorhanden [191].

3.4.7 Reinigung des OmpF-Trimers

Zur Reinigung der rückgefalteten trimeren Poren wurden zwei getrennte Strategien verfolgt, die beide die enorme Stabilität der trimeren Struktur ausnutzten. Zum einen wurden alle Proben für BLM-Messungen mittels SDS-PAGE getrennt und die OmpF-Trimere aus den ausgeschnittenen Gelbanden mit Hilfe des Rosenbusch-Tensids *n*-Octylpolyoxyethylen (OPOE) extrahiert. Dazu wurden 150 μ l eines Rückfaltungsansatzes mit 50 μ l 4 \times SDS-Probenpuffer gemischt und auf ein 12 %-iges SDS-Gel mit 10 Taschen vollständig aufgetragen, ohne die Proben bei 95 °C zu denaturieren. Nach der Elektrophorese wurde eine Bahn des Gels durch einen vertikalen Schnitt abgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Dieser Streifen diente dann als Schablone, um den Größenbereich der Trimerbande im restlichen, ungefärbten Gel auszuschneiden. Die Gelbanden wurden zerkleinert und über Nacht in Extraktionspuffer (20 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,3, 0,5 % OPOE v/v) bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde der flüssige Überstand von den zurückbleibenden Gelstücken vorsichtig abgenommen, um Schaumbildung zu vermeiden

und bei 4 °C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden nach der BCA-Methode bestimmt. Die auf diese Weise präparierten Proben wurden zur Bestimmung der Ionenkanalaktivität in BLM-Messungen eingesetzt.

Die OmpF-Trimere für CD-Messungen wurden unter Ausnutzung ihrer Resistenz gegenüber Proteasen gereinigt. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Rückfaltungsansätze mit Trypsin (Trypsin/Protein = 1:100 w/w, *Roth*) über Nacht bei 37 °C behandelt. Anschließend wurden die intakten Trimere von Trypsin und den verdauten Proteinfragmenten über Anionenaustausch-Chromatographie abgetrennt. Dazu wurden die Proteinlösungen auf eine mit Anionenaustausch-Puffer (20 mM Tris pH 8,3, 1% OPOE v/v) äquilibrierte HiTrap Q HP Säule aufgetragen und mit einem Salzgradienten bis 1 M NaCl eluiert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit BCA bestimmt.

3.4.8 Messung des zirkulären Dichroismus

Eine Möglichkeit zur Charakterisierung der Sekundärstrukturelemente eines gefalteten Proteins stellt die Messung des zirkulären Dichroismus (CD) einer gereinigten Proteinlösung dar. Im Wellenlängenbereich des fernen UV tragen dabei hauptsächlich Peptidbindungen und in geringerem Maße aromatische Aminosäure-Seitenketten zur Absorption von linear polarisiertem Licht bei. Dieses wird von zwei zirkulär polarisierten Vektoren mit gleicher Intensität zusammengesetzt, einer rechts zirkulär polarisierten und einer links zirkulär polarisierten Komponente, die getrennt voneinander gemessen werden können. Bedingt durch die Chiralität der Aminosäuren und die Asymmetrie der direkten Umgebung innerhalb der Proteinstruktur werden beide Komponenten des eingestrahlten Lichts beim Durchgang durch die Proteinlösung in unterschiedlichem Maße absorbiert mit einer Absorptionsdifferenz von $\Delta A = A_L - A_R$. Danach liegt der Lichtvektor nicht mehr in linear polarisierter Form vor, sondern der resultierende Vektor beschreibt dann eine Ellipse, wobei das Längenverhältnis der Haupt- und Nebenachse, das gleich $\tan \theta$ ist, die Elliptizität θ bestimmt. Die Absorptionsdifferenz angegeben in Absorptionseinheiten und die Elliptizität in mdeg (10^{-3} Grad) hängen über $\Delta A = 33000 \times \theta$ zusammen. Bei Proteinen wird in den Spektren des zirkulären Dichroismus die molare Elliptizität $[\theta]$ gemäß Gl. 8 bezogen auf die Anzahl der Peptidbindungen angegeben.

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot MW}{10 \cdot c \cdot l \cdot n} \quad \text{Gl. 8}$$

Dabei bezeichnet θ die Elliptizität in mdeg (10^{-3} Grad), MW das Molekulargewicht in g/mol, c die Proteinkonzentration in mg/ml, l die Weglänge der Küvette in cm und n die Anzahl der

Peptidbindungen innerhalb des Proteins (339 für OmpF). Damit ergibt sich für die molare Elliptizität $[\theta]$ die Einheit $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$. Da die Umgebungen der Peptidbindung innerhalb verschiedener Sekundärstrukturelemente wie α -Helix, β -Faltblatt oder *random coil* sehr charakteristisch sind, ergeben sich auch für Proteine, die diese Elemente zu einem bestimmten Anteil enthalten, sehr charakteristische CD-Spektren.

Die Spektren des zirkulären Dichroismus (CD) wurden mit einem Jasco J-715 Spektropolarimeter bei 8 °C aufgenommen. Die Kühlung war notwendig, um eine reversible Trübung der Proteinlösung zu verhindern. Für das rekombinante Referenzprotein **26** (0,25 mg/ml) wurde eine Quarzküvette mit einer Laufweite von 0,1 mm verwendet, während das OmpF-Spleißprodukt **23** (0,03 mg/ml) in einer 1 mm Küvette vermessen wurde. Es wurde der Wellenlängenbereich von 190-260 nm mit Inkrementen von 1 nm und 20 Akkumulationen aufgenommen. Der Elutionspuffer der Anionenaustausch-Chromatographie wurde zur Messung der Hintergrundspektren verwendet.

3.4.9 Einzelmolekül-Ionenkanalmessungen nach dem *Black Lipid Membrane* Verfahren

Die Messungen der Ionenkanalaktivität einzelner OmpF-Poren in einer planaren Lipiddoppelschicht wurden gemäß Abbildung 22 in einer aus zwei Kammern aufgebauten Apparatur (BCH-22A) durchgeführt, die eine Küvette aus Polystyrol (CP2A) mit einer Öffnung von 0,20 mm enthielt (BCH-22A bzw. CP2A von *Warner Instruments*). Die *cis* und *trans*-Seite der Apparatur wurden mit 2,5 ml BLM-Puffer (5 mM HEPES pH 7,2, 150 mM KCl) befüllt und standen nur durch die 0,20 mm große Öffnung in der Polystyrolküvette in Kontakt. Die *Black Lipid Membrane* wurde ausgebildet, indem 1 μl einer 4:1 Mischung aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylethanolamin (25 mg/ml in *n*-Decan) zur *trans*-Seite hinzugegeben wurde und die Pufferlösung über die Öffnung auf und abpipettiert wurde. Danach wurden 1-5 μl der Mizellenlösungen mit den trimeren Ionenkanälen (0,1-1 mg/ml) zur *trans*-Seite gegeben. Die Membran wurde erneut gezogen und eine Spannung von 140 mV angelegt. Die Aufzeichnung der Stromstärke erfolgte mit Hilfe des *Patch-Clamp* Verstärkers Axopatch 200B, einem Digidata 1200B A/D Konverter und der pClamp 9 Software (*Axon Instruments*). Die Aufnahmefrequenz lag bei 5 kHz. Gefiltert wurden die Daten zur weiteren Analyse mit einem digitalen Filter von 200 Hz der pClamp 9.2 Software.

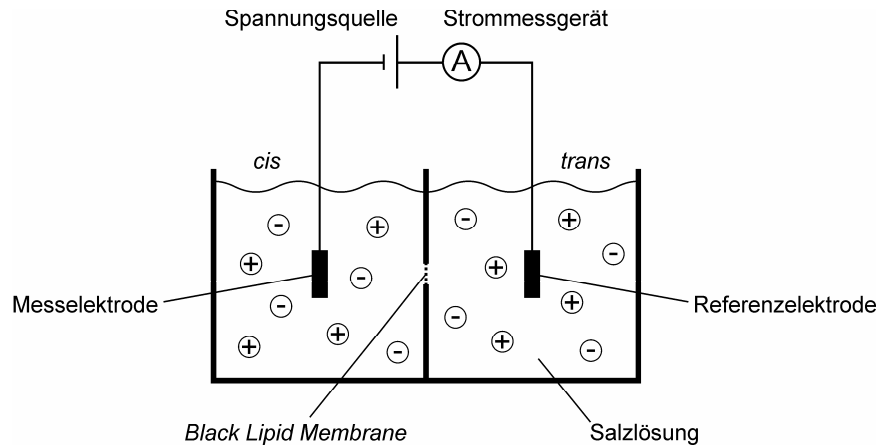


Abbildung 22: Apparatur zur Messung der Aktivität einzelner Ionenkanäle in einer planaren Lipiddoppelschicht (*Black Lipid Membrane*). Die angelegte Spannung von 140 mV führt zu einem messbaren Strom im Bereich einiger pA, wenn ein Ionenkanal in der Membran integriert vorliegt und einen Ionenfluss durch sein Porenolumen ermöglicht.

Zur quantitativen Auswertung der Leitwerte der von jedem Monomer aufgebauten Poren innerhalb eines Trimers wurden Einzelkanalmessungen oberhalb der kritischen Spannung ($V_C \approx 130$ mV) von OmpF durchgeführt [160,192]. Auf diese Weise konnte das konzertierte Öffnungsverhalten des Trimers und die stufenweisen Schließereignisse der einzelnen Monomere verfolgt werden, bevor sich weitere Kanäle in die Membran einbauten. Die durch Monomerschließereignisse hervorgerufenen Stromstärkedekremente wurden gemittelt und die Standardabweichungen der einzelnen Werte bestimmt, wobei immer 15-30 Werte ausgewertet wurden. Aufgrund des ohmschen Verhaltens der OmpF-Kanäle konnte nach Gl. 9 aus dem mittleren Stromfluss I je Pore und der angelegten Spannung U der elektrische Leitwert G (Konduktanz) berechnet werden. Dieser entspricht dem reziproken Wert des elektrischen Widerstands R und gibt die Fähigkeit der untersuchten Ionenkanäle an, einen Strom der eingesetzten Ionen durch das Porenolumen zu ermöglichen.

$$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} \quad \text{Gl. 9}$$

3.4.10 Massenspektrometrische Analyse der mit Trypsin verdauten Proteine

Zur massenspektrometrischen Charakterisierung einzelner Proteine wurden diese nach gelelektrophoretischer Trennung oder direkt in Lösung mit der Protease Trypsin verdaut, die die Polypeptidkette nach den basischen Aminosäuren Arginin sowie Lysin hydrolytisch spaltet. Die Massen der auf diese Weise erhaltenen relativ kurzen Proteinfragmente konnten anschließend mittels MALDI-TOF entweder als Gemisch oder nach Trennung mittels HPLC

bestimmt werden, wodurch auf die erwartete Zusammensetzung der eingesetzten Proteine zurückgeschlossen werden konnte.

Zum In-Gel-Verdau einzelner Proteinbanden wurden diese nach SDS-PAGE und Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau möglichst knapp aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mit 200 µl Waschlösung (200 mM NH_4HCO_3 , 50 % (v/v) Acetonitril) durch Schütteln bei 37 °C entfärbt. Nach Entfernung der Waschlösung wurden die Gelstücke im Vakuum getrocknet und anschließend mit etwa 10 µl Trypsinlösung (40 mM NH_4HCO_3 pH 8,1, 10 % (v/v) Acetonitril, 0,02 µg/µl Trypsin (*Roche*, Sequencing Grade)) versetzt, bis diese vollständig in das Gelstück eingezogen war. Nach Verdau über Nacht bei 37 °C wurden 15 µl Diffusionslösung (10 % (v/v) Acetonitril, 1 % Trifluoressigsäure) hinzugefügt und 45 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad inkubiert. Zur anschließenden Charakterisierung mittels MALDI-TOF wurde 1 µl der Verdaulösung auf der Targetplatte mit 1 µl Matrixlösung (2,5-Dihydroxybenzoesäure gesättigt in 30 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure) gemischt und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Kalibration des Massenspektrometers (*Bruker Daltonics* AutoFlex III) diente ein tryptischer Verdau von bovinem Serumalbumin (*Bruker*).

Die Verdaue der Proteinlösungen (etwa 50 µM) wurden in Phosphatpuffer durch Zugabe einer Trypsinlösung (*Roth*, 1 mg/ml in 40 mM NH_4HCO_3 pH 8,1, 10 % (v/v) Acetonitril) in einem Verhältnis Trypsin/Protein von 1:100 und anschließender Inkubation über Nacht bei 37 °C realisiert. Die Trennung der einzelnen Fragmente erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einem 1100 HPLC-System unter Verwendung einer Zorbax 300SB-C3 Säule (*Agilent*). Von den Verdaulösungen wurden 50 µl aufgetragen und durch Variation des Laufmittels A (0,1 % TFA in Wasser) durch das Laufmittel B (0,1 % TFA in Acetonitril) mit dem aufgeführten Gradienten getrennt.

Zeit / min	0	3	45	55	60
Anteil B / %	5	5	40	60	100

Die Elution der getrennten Fragmente wurde über die Absorption bei 210 nm verfolgt und die einzelnen Fraktionen manuell gesammelt. Die fraktionierten Fragmente wurden anschließend mittels MALDI-TOF identifiziert, indem ihre Massen mit Hilfe der Anwendung *PeptideMass* des ExPASy-Servers berechnet und mit den experimentell bestimmten Fragmentgrößen verglichen wurden [193].

4 Ergebnisse

Mit dem Vorhaben, die Protein *trans*-Spleißreaktion von künstlich gespaltenen Inteinen als leistungsfähige Methode zur Protein-Semisynthese weiter zu etablieren, wurden zwei unabhängige Projekte realisiert, deren experimentelle Daten sowie Auswertungen und Interpretationen in diesem Kapitel präsentiert werden. Zum einen wurde die Protein *trans*-Spleißreaktion des *Ssp* DnaB Inteins *in vitro* und unter nativen Bedingungen charakterisiert und mit dem gespaltenen *Sce* VMA Intein verglichen. Zusätzlich wurde die Spleißaktivität des neu entdeckten *Ckl* PTerm Inteins ermittelt. Im zweiten Projekt wurde dagegen die Spleißaktivität des *Psp*-GBD Pol Inteins in Anwesenheit denaturierender Harnstoffkonzentrationen ausgenutzt, um das integrale Membranprotein OmpF aus zwei Fragmenten zusammenzusetzen. Der Einbau eines synthetischen Kronenetherderivats auf diesem Wege diente zur Konstruktion eines semisynthetischen Ionenkanals auf der Basis des OmpF-Porins. Dieses Projekt wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Lars-Oliver Essen und Prof. Dr. Ulrich Koert von der Philipps-Universität Marburg verwirklicht. Die Synthese des Kronenetherderivats sowie der Alkin-Reagenzien für die Click-Reaktionen wurde von Dr. Menekşe Çebi durchgeführt, während alle aufgeführten Ionenkanalmessungen von Dr. Philipp Reiß realisiert wurden. Dr. Simon Reitz stellte aus der Membran von *E. coli* extrahierte trimere OmpF-Poren sowie eine verkürzte Variante als Referenzproteine zur Verfügung.

4.1 Charakterisierung des gespaltenen *Ssp* DnaB Inteins

Zur Etablierung eines neuen auf künstliche Weise gespaltenen Inteins, das auch *in vitro* die Protein *trans*-Spleißreaktion effizient vermitteln kann, wurden die Arbeiten von Liu und Mitarbeitern zugrunde gelegt [27]. Sie benutzten als Ausgangspunkt das 429 Aminosäuren umfassende *Ssp* DnaB Intein, das ursprünglich in die DnaB Helicase des Cyanobacteriums *Synechocystis* sp. PCC6803 integriert ist, zur Konstruktion eines aktiven Mini-Inteins, aus dem 275 zur Endonucleasedomäne gehörende Aminosäuren entfernt wurden. Darüber hinaus ergab eine Spaltung an dieser Deletionsstelle einen N-terminalen Spleißbereich mit einer Größe von 106 Aminosäuren sowie einen komplementären C-terminalen Spleißbereich mit 48 Resten, die bei Coexpression in *E. coli* mit heterologen Exteinsequenzen die Protein *trans*-Spleißreaktion vermitteln konnten und das Spleißprodukt mit guten Ausbeuten lieferten. Im Folgenden werden weiterführende *in vitro* Experimente vorgestellt, die die spontane Reaktivität des gespaltenen *Ssp* DnaB Inteins in gereinigter Form belegen und aus denen die kinetischen Eigenschaften der vermittelten Protein *trans*-Spleißreaktion abgeleitet wurden.

4.1.1 *In vitro* Experimente zur Bestimmung der Spleißaktivität unter nativen Bedingungen

Zu Beginn dieser Arbeit waren ausschließlich solche artifiziell gespaltenen Inteine bekannt, die vermutlich aus Gründen der Fehlfaltung der einzelnen Inteinfragmente ein zelluläres Umfeld oder in gereinigter Form einen Denaturierungsschritt mit anschließender gemeinsamer Rückfaltung der Inteinhälften benötigten, um den aktiven *trans*-spleißenden Intein-komplex zu bilden [27,48,49,52,54,67]. Der Einsatz dieser Inteine für potentielle Fragment-Ligationen blieb damit auf *in vivo* Applikationen und rückfaltbare Proteine beschränkt. In vielen Fällen ist jedoch eine Umsetzung gereinigter Proteine unter nativen Bedingungen zum Erhalt der Proteinaktivität wünschenswert. Neben dem in natürlicher Form gespaltenen *Ssp* DnaE Intein stand für solche Anwendungen lediglich das künstlich gesplattene *Sce* VMA Intein zur Verfügung, dessen Aktivität allerdings an eine induzierte Assoziation durch Dimerisierungsdomänen gebunden war ([62,65], Kapitel 1.2.2 und 4.1.3). Wie sich das *Ssp* DnaB Intein in gesplattener Form unter vergleichbaren Bedingungen verhielt, steht nun im Fokus dieses Kapitels.

Zur Untersuchung der Protein *trans*-Spleißreaktion in Abhängigkeit des FKBP-FRB-Heterodimerisierungssystems (siehe Kapitel 1.2.2) wurde die N-terminale Inteinhälfte des *Ssp* DnaB Inteins, bestehend aus den Resten 1-104, mit dem Maltose-bindenden-Protein (MBP) als N-Extein und C-terminal mit dem FK506-bindenden Protein (FKBP) sowie einer Hexahistidinsequenz (His₆) fusioniert, wodurch Konstrukt **1** (MBP-*Ssp* DnaB^N-FKBP-His₆) erhalten wurde. Das komplementäre Konstrukt **2** setzte sich aus den Inteinaminosäuren 382-429 mit MBP und der FKBP-Rapamycin-bindenden Domäne (FRB) an deren N-Terminus sowie einem kurzen, das essentielle Ser+1 und eine Histidinsequenz (SIRS-His₆) enthaltenden C-Extein zusammen (MBP-FRB-*Ssp* DnaB^C-His₆). Beide Konstrukte sowie die Struktur des oben erwähnten konstruierten Mini-Inteins, das weitestgehend die Struktur des spleißaktiven Intein-komplexes abbilden sollte, sind in Abbildung 23A und B schematisch dargestellt. In diesem heterologen Kontext wurde das Intein an beiden Spleißstellen noch von je zwei nativen Exteinresten flankiert. Nach zweimaliger affinitätschromatographischer Reinigung aus der cytosolischen Fraktion von *E. coli* mit Hilfe der Histidinsequenz sowie des enthaltenen MBP wurden die Proteine in gleichen molaren Verhältnissen zur Protein-Spleißreaktion eingesetzt. Diese wurde unter nativen Bedingungen bei 25 °C in einem Experiment mit Rapamycin als überbrückendem Ligand der FKBP- und FRB-Domänen sowie in einem anderen in dessen Abwesenheit durchgeführt. Wie in Abbildung 23C zu sehen ist, führten beide Reaktionen nach zwei Stunden in vergleichbarem Umfang (~40 %) zur Bildung

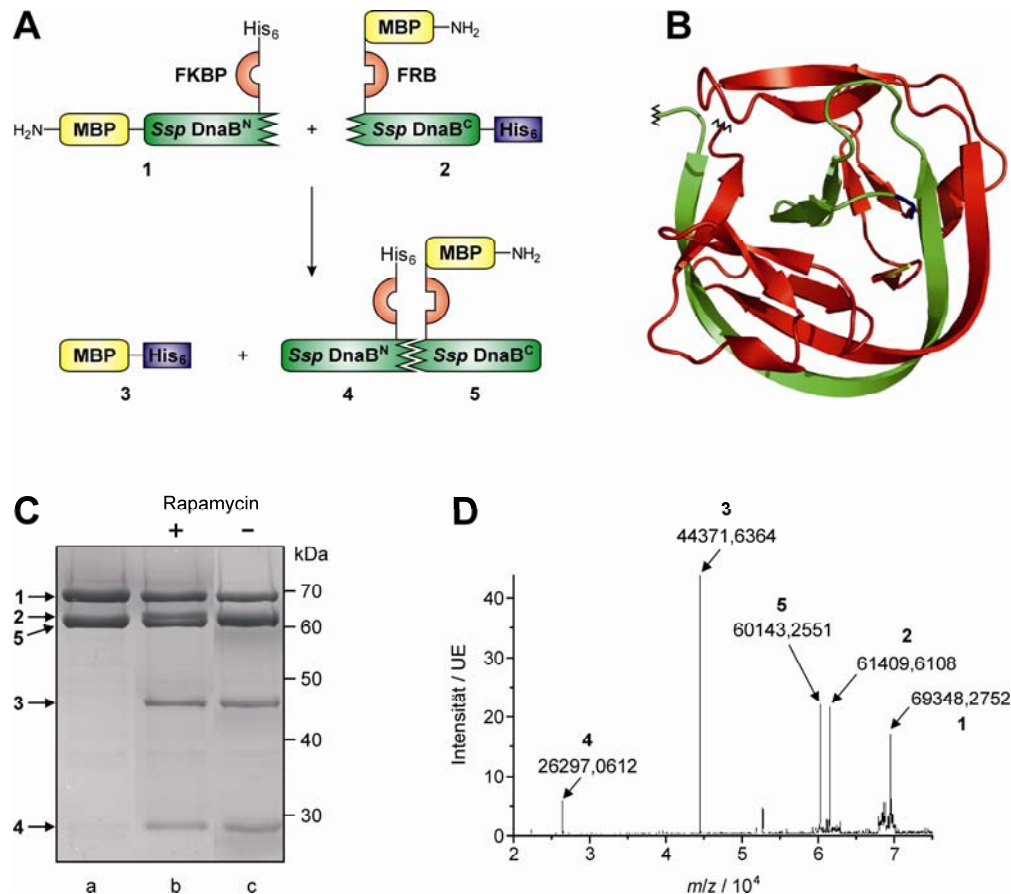


Abbildung 23: Protein *trans*-Spleißreaktion des geteilten *Ssp* DnaB Inteins unter nativen Bedingungen. (A) Schematische Darstellung der Spleißreaktion (MBP: Maltose-bindendes Protein, *Ssp* DnaB^N: AS 1-104, *Ssp* DnaB^C: AS 382-492, FKBP: FK506-bindendes Protein, FRB: FKBP-Rapamycin-bindende Domäne, C-Extein (blau): SIRS-His₆). (B) Struktur des konstruierten *Ssp* DnaB Mini-Inteins (PDB-Datei: 1mi8). Zur Verdeutlichung der beiden Inteinfragmente in geteilter Form sind die Reste der N-terminalen Inteinhälfte in rot und der C-terminalen in grün dargestellt. Die enthaltenen je zwei Exteinreste sind gelb und blau gefärbt. Die Spaltung wurde innerhalb einer flexiblen Region vorgenommen, die in der Struktur nicht sichtbar aber zwischen den gezackten Linien zu finden ist. (C) SDS-PAGE Gel der Reaktion (a: Ausgangskonstrukte bei Reaktionsbeginn, b: Reaktion mit Rapamycin nach 2 h, c: Reaktion ohne Rapamycin ebenfalls nach 2 h). (D) Massenspektrometrische Analyse (ESI-MS) einer Spleißreaktion nach 2h. Die berechneten Massen sind: 69352,5 Da (1), 61406,2 Da (2), 44369,9 Da (3), 26267,0 Da (4) und 60139,9 Da (5).

der erwarteten Reaktionsprodukte: den ligierten Exteinsequenzen MBP-His₆ (3) sowie den freigesetzten Inteinhälften 4 und 5. Das künstlich geteilte *Ssp* DnaB Intein war somit auch in gereinigter Form und unter nativen Bedingungen spleißaktiv. Überdies war die spontan einsetzende Protein *trans*-Spleißreaktion prinzipiell nicht von einer induzierten Dimerisierung abhängig. Als Voraussetzung für die spontan ablaufende Reaktion musste eine ausgeprägte Affinität der Inteinhälften zueinander angenommen werden. Eine womöglich rudimentäre Faltung der Inteinfragmente könnte gegebenenfalls zu einer günstigen Präsentation von Erkennungsmotiven geführt haben, die eine Assoziation über nicht-kovalente Wechselwirkungen sowie die endgültige Faltung des aktiven Inteincomplexes ermöglichte. Dieser war schließlich in der Lage, die Protein *trans*-Spleißreaktion ohne Auftreten von Nebenreaktionen zu vermitteln, bevor er unter den Bedingungen der SDS-PAGE wieder dissoziierte. Neben-

reaktionen konnten durch eine massenspektrometrische Analyse ausgeschlossen werden (Abbildung 23D).

4.1.2 Kinetische Analyse der Protein *trans*-Spleißreaktion

Um der Frage weiter nachzugehen, ob die durch Rapamycin induzierte Heterodimerisierung der FKBP- und FRB-Domänen und die damit begünstigte Annäherung der komplementären Inteinhälften einen Einfluss auf die Spleißaktivität des gespaltenen *Ssp* DnaB Inteins ausübten, wurde die Zeitabhängigkeit der Spleißproduktbildung mittels SDS-PAGE und anschließender densitometrischer Auswertung der Bandenintensitäten untersucht. In Abbildung 24B und D kann der zeitliche Verlauf der Reaktion der Proteine **1** und **2** ohne Zugabe des Liganden verfolgt werden, der nach einer Stunde ein Plateau bei einem Umsatz von etwa 40 % erreichte. Im Vergleich ließ das Profil der Reaktion mit Rapamycin zunächst keinen positiven Effekt der Dimerisierungsdomänen erkennen, der sich auch bei längeren Reaktionszeiten nicht einstellte (nicht dargestellt). Für eine genauere kinetische Analyse, die in Kapitel 3.3 erläutert ist, wurde die vereinfachende Annahme gemacht, dass die Protein *trans*-Spleißreaktion aufgrund der sehr schnell verlaufenden Assoziation der Inteinfragmente und des geschwindigkeitsbestimmenden Charakters der nachfolgenden Spleißreaktion insgesamt als ein irreversibel ablaufender Prozess erster Ordnung beschrieben werden kann. Deshalb wurde die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k , die durch Regression mit einer einfach exponentiellen Sättigungsfunktion (Gl. 5) erhalten wurde und deshalb zunächst formal erster Ordnung war, hauptsächlich durch die langsame Spleißreaktion mit der Konstante $k_{\text{Spleiß}}$ bestimmt. Im Rahmen der methodischen Genauigkeit zeigte die Konstante der Reaktion ohne Rapamycin $k = 7,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ dabei keinen deutlichen Unterschied zur Geschwindigkeitskonstante der Spleißreaktion mit induzierter Dimerisierung mit $k = 1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Die daraus berechneten Halbwertszeiten betrugen 16 min bzw. 11 min. Eine gute Übereinstimmung des vereinfachten kinetischen Modells mit den erhaltenen Messwerten wurde durch die hohen Werte des Bestimmtheitsmaßes deutlich ($R^2 = 0,982$ und $R^2 = 0,990$). Eine Grundannahme zu Beginn der kinetischen Auswertung war, dass nur ein begrenzter Anteil der zur Reaktion eingesetzten Proteine in der Lage war, den spleißkompetenten Inteinkomplex zu bilden. Dieser Anteil P_{aktiv} entsprach nach dem Modell dem maximalen Reaktionsumsatz von etwa 40 %. Demnach mussten 60 % der vorliegenden Ausgangskonstrukte in einer inaktiven Form vorliegen. Hinweise für das Auftreten von spleißinkompetenten Aggregaten wurden von Joachim Zettler aus Untersuchungen der Ausgangskonstrukte eines anderen gespaltenen

Inteins (*Npu* DnaE) durch Größenausschluss-Chromatographie abgeleitet (persönliche Mitteilung).

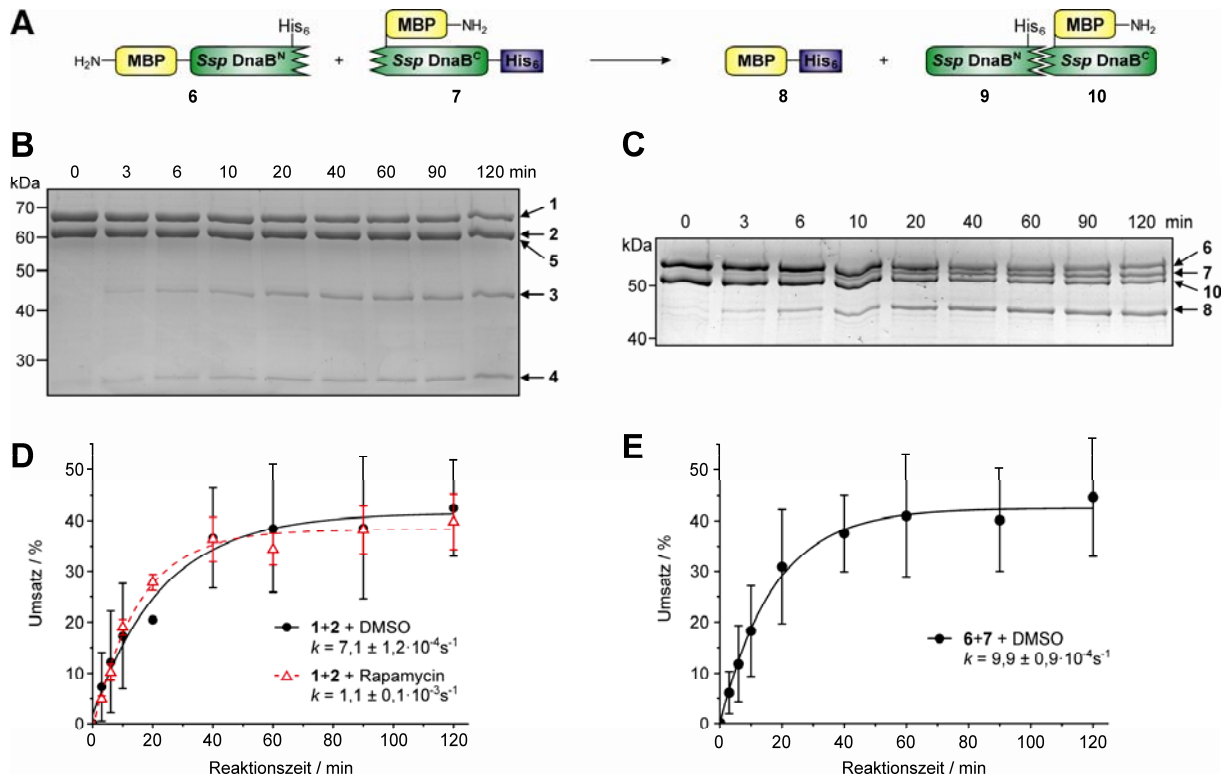


Abbildung 24: Kinetische Analyse der Protein *trans*-Spleißreaktion des gespaltenen *Ssp* DnaB Inteins zur Untersuchung des Einflusses fusionierter Dimerisierungsdomänen. (A) Schematische Darstellung der Reaktion der Konstrukte 6 und 7 ohne FKBP- und FRB-Dimerisierungsdomänen (C-Extein (blau): SIRSRS-His₆). (B) SDS-PAGE Gel der Reaktion von 1 und 2 ohne Rapamycin. (C) Elektrophoretische Analyse der Reaktion von 6 und 7. Eine massenspektrometrische Untersuchung (ESI-MS) bestätigte die Größen der Ausgangskonstrukte und Reaktionsprodukte (6: berechnet 56408,9 Da, gefunden 56403 Da; 7: ber. 50124,3 Da, gef. 50127 Da; 8: ber. 44613,2 Da, gef. 44616 Da; 9: ber. 13323,3 Da, gef. 13324 Da; 10: ber. 48614,6 Da, gef. 48620 Da). (D) Zeitlicher Verlauf der Reaktionen von 1 und 2 mit bzw. ohne induzierter Dimerisierung. Der Reaktion ohne Rapamycin wurde als Kontrolle das Lösungsmittel DMSO zugesetzt. Die Regression erfolgte mit Hilfe des Ausdrucks $SP = P_{aktiv} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) + SP_0$ (Gl. 5). Die Parameter $R^2 = 0,982$, $P_{aktiv} = 39,7 \%$ und $SP_0 = 1,6 \%$ wurden der Reaktion mit DMSO und $R^2 = 0,990$, $P_{aktiv} = 39,2 \%$ und $SP_0 = -1 \%$ der Reaktion mit Rapamycin entnommen. (E) Kinetik der Reaktion von 6 und 7 mit DMSO ($R^2 = 0,994$, $P_{aktiv} = 42,9 \%$ und $SP_0 = -0,5 \%$).

Zur Untersuchung der Reaktion völlig unabhängig von Affinitätsdomänen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Kurpiers ein zweites Reaktantenpaar konstruiert, dem die entsprechenden Domänen fehlten [178]. Die Proteine MBP-DnaB^N-His₆ (6) und MBP-DnaB^C-His₆ (7) zeigten einen völlig analogen Reaktionsverlauf bei der Bildung des Spleißprodukts 8 mit einer Geschwindigkeitskonstante $k = 9,9 \pm 0,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, einer Halbwertszeit von 12 min und einer maximalen Ausbeute von 43 % (Abbildung 24 C und E). Die präsentierten Ergebnisse belegen somit, dass die untersuchten Protein *trans*-Spleißreaktionen durch den Einsatz von Heterodimerisierungsdomänen nicht signifikant beschleunigt oder zu höheren Ausbeuten getrieben werden konnten. Die Parameter der Reaktion werden lediglich durch die Eigenschaften des Inteins bestimmt. Damit stellte das *Ssp* DnaB Intein das erste

Beispiel eines künstlich gespaltenen Inteins dar, das spontan, ohne forcierte Dimerisierung und unter nativen Bedingungen in der Lage war, die Protein *trans*-Spleißreaktion in heterologer Umgebung mit guten Ausbeuten innerhalb etwa einer Stunde zu vermitteln. Dies bildete unter anderem die Grundlage für die Entwicklung der Cys-Tag-Methodik zur chemo- und regioselektiven Cystein-Biokonjugation am C-Terminus von Proteinen (Kapitel 1.2.3, [73]).

4.1.3 Vergleich mit dem gespaltenen *Sce* VMA Intein

Auf die oben beschriebene Weise wurde ebenfalls das gespaltene *Sce* VMA Intein analysiert, dessen konditionelle Protein-Spleißreaktion bisher ausschließlich nach dem *Western Blot*-Verfahren detektiert [62,63] oder im Kontext anderer Dimerisierungsdomänen kinetisch untersucht worden war [65]. Die Konstrukte **11** (MBP-*Sce* VMA^N-FKBP-His₆) und **12** (MBP-FRB-*Sce* VMA^C-His₆) enthielten anstelle des *Ssp* DnaB Inteins die Inteinfragmente *Sce* VMA^N (1-184) und *Sce* VMA^C (390-454) in Fusion mit den Domänen zur Heterodimerisierung mit Rapamycin (Abbildung 25A). Wie erwartet zeigten die Konstrukte aufgrund fehlender Affinität ohne den Ligand bei der Bildung des Spleißprodukts **13** nur Hintergrundaktivität mit einer Ausbeute von etwa 10 % nach zwei Stunden Reaktionszeit (Abbildung 25D). Erst durch die induzierte Dimerisierung mit Rapamycin wurde eine erhöhte Spleißaktivität erreicht, die zu dem in Abbildung 25B und D dargestellten Reaktionsprofil führte. Eine Ausbeute von über 70 % nach zwei Stunden deutete an, dass nur ein geringer Teil der Inteinstrukturen in inaktiver Form vorlag. Aus diesen Daten ließ sich eine Geschwindigkeitskonstante $k = 1,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und eine Halbwertszeit von 11 min ableiten. Die Kongruenz des kinetischen Modells und der experimentellen Befunde war in diesem Fall jedoch nicht zufrieden stellend ($R^2 = 0,949$, grau gestrichelte Kurve in Abbildung 25D), weshalb die Regression wie in Kapitel 3.3 beschrieben mit Hilfe einer doppelt exponentiellen Sättigungsfunktion (Gl. 7) erneut durchgeführt wurde, die mit $R^2 = 0,999$ eine deutlich bessere Anpassung lieferte (siehe Tabelle 3). Nach diesem Modell wurde die Protein *trans*-Spleißreaktion der Konstrukte **11** und **12** als ein Prozess mit zwei Phasen beschrieben, einer schnellen mit einer Geschwindigkeitskonstante $k_1 = 6,8 \pm 0,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und einem Beitrag (Amplitude) von $A_1 = 27,9 \%$ sowie einem langsamer verlaufenden mit den Parametern $k_2 = 3,5 \pm 0,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $A_2 = 46,2 \%$. Um weitere Aussagen über die tatsächlichen Reaktionsordnungen treffen zu können und daraus Schlüsse über den zugrunde liegenden Mechanismus der einzelnen Phasen zu ziehen, müssten die Abhängigkeiten der einzelnen Konstanten von den Reaktantenkonzentrationen detailliert untersucht werden. Dennoch war die hier

beschriebene Protein-Spleißreaktion des *Sce* VMA Inteins deutlich schneller als in einer zuvor durchgeführten Studie ($k = 1,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, [62]), obwohl sich die analysierten Konstrukte kaum unterschieden. Dies könnte als ein Hinweis auf den Einfluss der Proteinpräparation auf die Spleißaktivität verstanden werden.

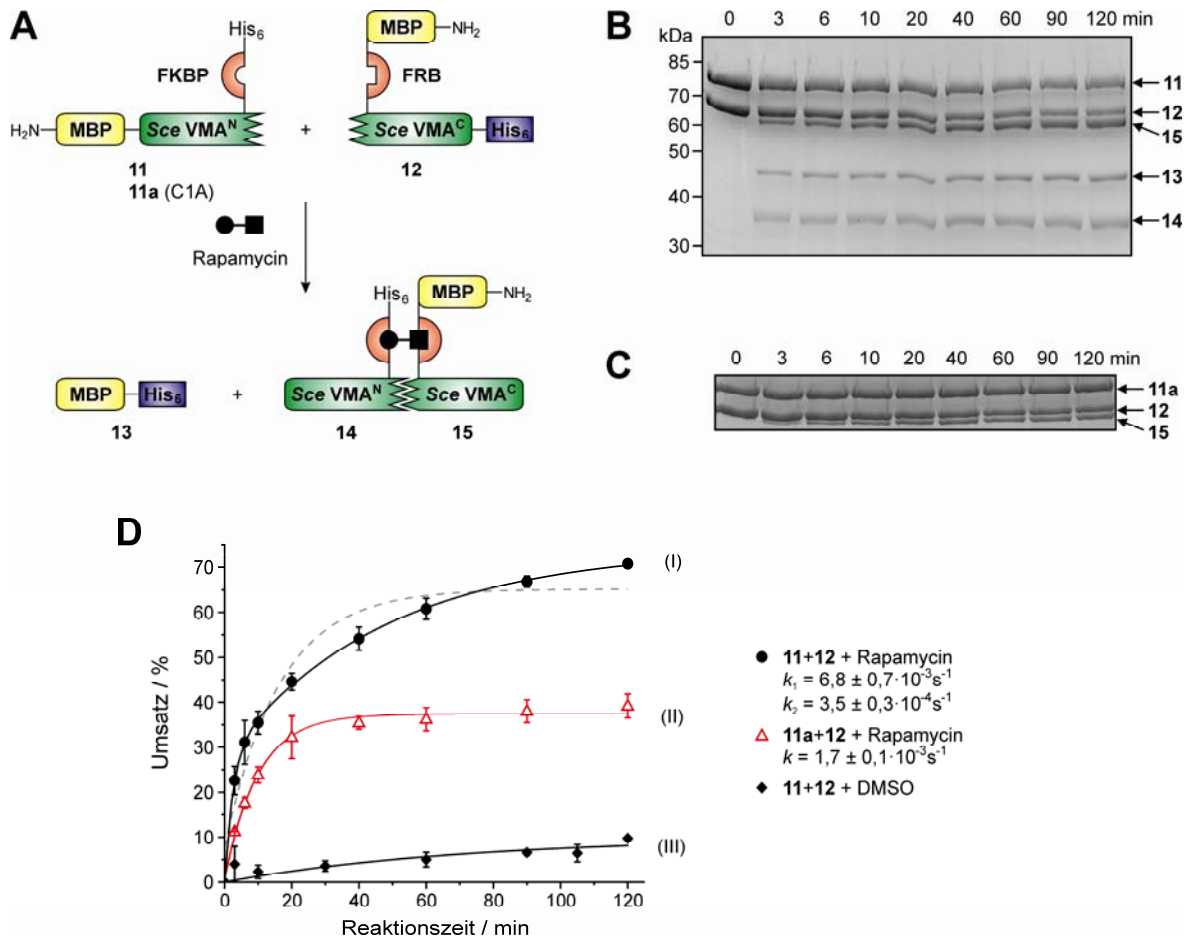


Abbildung 25: Kinetische Analyse der Protein *trans*-Spleißreaktion des gespaltenen *Sce* VMA Inteins. (A) Schematische Darstellung der Spleißreaktion mit induzierter Assoziation durch den Ligand Rapamycin (*Sce* VMA^N: AS 1-184, *Sce* VMA^C: AS 390-454, C-Extein (blau): CDEKEDGSRs-His₆). (B) SDS-PAGE Gel der Reaktion von **11** und **12** mit Rapamycin (**11**: 78,6 kDa, **12**: 64,1 kDa, **13**: 45,2 kDa, **14**: 35,4 kDa, **15**: 62,1 kDa). (C) SDS-PAGE Gel der C-terminalen Spaltungsreaktion der Proteine **11a** (mit einer C1A Mutation im Intein, 78,5 kDa) und **12**. (D) Kinetische Auswertung der konditionellen Spleißreaktion von **11** mit **12** (I), der C-terminalen Spaltung der Proteine **11a** und **12** (II) sowie der Hintergrundaktivität von **11** und **12** mit dem Lösungsmittel DMSO anstelle von Rapamycin (III). Die Reaktion (I) wurde mittels einer doppelt exponentiellen Sättigungsfunktion ausgewertet ($R^2 = 0,999$, $A_1 = 27,9 \%$, $A_2 = 46,2 \%$, $SP_0 = 0,1 \%$). Die entsprechende Auswertung mit einer einfach exponentiellen Funktion ergab die grau gestrichelte Kurve ($R^2 = 0,949$, $k = 1,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $P_{\text{aktiv}} = 57,5 \%$ und $SP_0 = 7,6 \%$). Für die C-terminale Spaltung (II) wurden die Parameter $R^2 = 0,995$, $P_{\text{aktiv}} = 36,7 \%$ und $SP_0 = 0,7 \%$ erhalten.

Interessanterweise zeigte die C-terminale Spaltungsreaktion dieses biphasische Verhalten nicht (Abbildung 25C und D). Die Spaltung wurde herbeigeführt, indem das Konstrukt **11a**, das aufgrund einer C1A Mutation des essentiellen Cysteins der N-terminalen Spleißstelle nicht mehr die Protein-Spleißreaktion eingehen konnte, mit **12** umgesetzt wurde. Dadurch konnte ausschließlich die C-terminale Spaltung, hervorgerufen durch die

Cyclisierung von Asn454, beobachtet werden. Der zeitliche Reaktionsverlauf konnte diesmal mit Hilfe einer einfach exponentiellen Sättigungsfunktion sehr gut beschrieben werden ($R^2 = 0,995$), die eine Geschwindigkeitskonstante $k = 1,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und eine Halbwertszeit von 7 min besaß. Die Ausbeute fiel mit etwa 40 % gegenüber der Spleißreaktion deutlich geringer aus. Da jedoch nicht genau bekannt ist, wie die C-terminale Spaltungsreaktion von den vorgelagerten Prozessen abhängt, kann über die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften nur spekuliert werden. Der biphasische Verlauf der Protein-Spleißreaktion deutete aber auf einen komplexeren Reaktionsablauf hin.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die kinetische Analyse ähnliche Geschwindigkeitskonstanten für die zum Teil sehr unterschiedlichen Reaktionen des *Ssp* DnaB und *Sce* VMA Inteins offenbarte (siehe Tabelle 3). Ein deutliches Unterscheidungsmerkmal war jedoch der höhere Anteil spleißkompetenter Ausgangsproteine des gespaltenen *Sce* VMA Inteins, der höhere Ausbeuten des Spleißprodukts ermöglichte. Zudem ließen sich während der Reaktion anhand der kinetischen Daten zwei Prozesse unterscheiden.

Tabelle 3: Daten der kinetischen Analyse der Protein *trans*-Spleißreaktionen des *Ssp* DnaB und *Sce* VMA Inteins.

Zeile	Reaktion	Intein	Geschwindigkeitskonstante k / s^{-1}	$P_{\text{aktiv}} / \%$	R^2	Rapamycin
1	1 + 2	<i>Ssp</i> DnaB	$7,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-4}$	39,7	0,982	-
2	1 + 2	<i>Ssp</i> DnaB	$1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	39,2	0,990	+
3	6 + 7	<i>Ssp</i> DnaB	$9,9 \pm 0,9 \cdot 10^{-4}$	42,9	0,994	-
4	11 + 12	<i>Sce</i> VMA	$1,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$ (einfach)	57,5	0,949	+
5	11 + 12	<i>Sce</i> VMA	$k_1 = 6,8 \pm 0,7 \cdot 10^{-3}$ (doppelt) $k_2 = 3,5 \pm 0,3 \cdot 10^{-4}$	$A_1 = 27,9$ $A_2 = 46,2$	0,999	+
6	11a + 12	<i>Sce</i> VMA	$1,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$ (C-Spaltung)	36,7	0,995	+

P_{aktiv} bezeichnet den Anteil spleißaktiver Ausgangskonstrukte, der mit der maximalen Spleißausbeute gleichzusetzen ist. R^2 steht für das Bestimmtheitsmaß der Regression. Zeile 4 gibt die Ergebnisse der Auswertung der Reaktion von **11** und **12** nach einfach exponentieller Regression wieder, während Zeile 5 die ermittelten Werte der doppelt exponentiellen Auswertung enthält. Zeile 6 beschreibt die C-terminale Spaltungsreaktion von **11a** (C1A Mutation im Intein) und **12**.

Die Kreuzreaktivität zwischen dem *Ssp* DnaB und dem *Sce* VMA Intein konnte mit den vorliegenden Konstrukten besonders gut untersucht werden. Durch die forcierte Heterodimerisierung mit Rapamycin konnten die Hälften des einen Inteins mit den Fragmenten des anderen in räumliche Nähe gezwungen werden, wodurch optimale Voraussetzungen für die

Protein *trans*-Spleißreaktion geschaffen wurden. Sofern elektrostatische Anziehung ähnlich wie beim *Ssp* DnaE Intein als grundlegende Wechselwirkung bei der Inteinkomplexbildung angenommen wird [46], sprechen die theoretischen isoelektrischen Punkte (pI) der Inteinfragmente für die Bildung gemischter Inteinkomplexe (DnaB^{N} : 9,5, DnaB^{C} : 3,8, VMA^{N} : 9,3, VMA^{C} : 5,6). In Abbildung 26 sind die jeweiligen Reaktionen in Anwesenheit von Rapamycin zu sehen. Die Spuren a und b des SDS-Gels zeigen die Reaktionen der Kreuzkombinationen von **11** und **2** bzw. von **1** und **12**, aus denen nach zwei Stunden kein Spleißprodukt mit einer erwarteten Größe von etwa 45 kDa hervorging. Setzte man dagegen einem Gemisch aus allen vier Konstrukten Rapamycin zu, so liefen die Spleißreaktionen beider Inteine ($\mathbf{1} + \mathbf{2} \rightarrow \mathbf{3} + \mathbf{4} + \mathbf{5}$ und $\mathbf{11} + \mathbf{12} \rightarrow \mathbf{13} + \mathbf{14} + \mathbf{15}$) unbeeinflusst nebeneinander ab (Spur c). Die gespaltenen Inteine sind demnach orthogonal und können für Mehrfachligationen parallel eingesetzt werden.

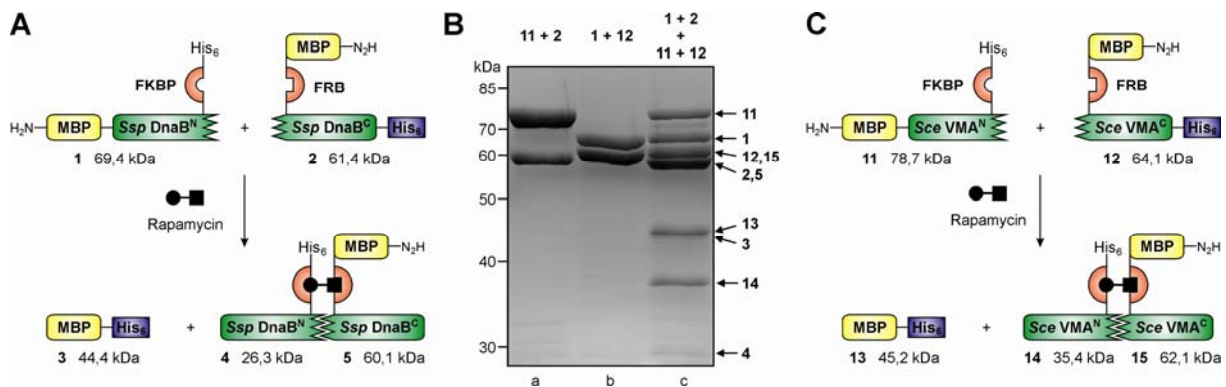


Abbildung 26: Orthogonalität des *Ssp* DnaB und *Sce* VMA Inteins. (A) Darstellung der Reaktion des *Ssp* DnaB Inteins. (B) SDS-PAGE Gel der Reaktion von **11** und **2** (Spur a), der Proteine **1** und **12** (Spur b) sowie einem Gemisch aus allen vier Konstrukten (**1+2** und **11+12**, Spur c) jeweils in Anwesenheit von Rapamycin. (C) Konditionelles Protein *trans*-Spleißen des *Sce* VMA Inteins.

4.1.4 Ein neues Intein aus *Clostridium kluyveri* ohne nucleophile Aminosäure an der N-terminalen Spleißstelle

Neben den bisher beschriebenen gespaltenen Inteinen wurde weiterhin mit der Charakterisierung des *Ckl* PTerm Inteins begonnen, das in die große Untereinheit einer Phagenterminase integriert vorliegt, die von dem Plasmid pCKL555A (59182 bp, Genbank: CP000674) des strikten Anaerobiers *Clostridium kluyveri* DSM555 kodiert wird [180]. Dieses theoretische, aus 402 Aminosäuren zusammengesetzte Maxi-Intein besitzt mit Alanin an Position 1 keine nucleophile Aminosäure an der N-terminalen Spleißstelle. Für die kleine Gruppe dieser Inteine ohne N-terminalem Nucleophil wird ein alternativer Spleißmechanismus mit einem direkten Angriff des +1 Nucleophils der C-terminalen Spleißstelle angenommen [23]. In Kooperation mit Dr. Henning Seedorf (MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) wurde

die Spleißaktivität des *Ckl* PTerm Inteins durch heterologe Expression getestet. Wie in Abbildung 27 dargestellt wurde das Intein in Konstrukt **16** von MBP sowie der FKBP-Domäne mit C-terminaler Hexahistidinsequenz flankiert, wobei zusätzlich noch jeweils fünf Exteinreste der nativen Umgebung enthalten waren. Bei der Expression in *E. coli* BL21 (DE3) sowie Rosetta (DE3) war zuerst keine Überexpression zu erkennen (vgl. Spur a und b). Nach Zellaufschluss und Behandlung der cytosolischen Fraktion mit Ni^{2+} -NTA-Chromatographiematerial konnte jedoch eine Bande mit der Größe des Spleißprodukts **17** (58,4 kDa, Spur e) aufgrund der enthaltenen Histidinsequenz angereichert werden. Diese Proteinbande wurde einem Verdau mit Trypsin unterzogen und die erhaltenen Fragmente massenspektrometrisch untersucht, wobei das abgebildete Spektrum erhalten wurde. Durch die bezeichneten Fragmente wurden 57 % der Sequenz des Spleißprodukts abgedeckt, womit es eindeutig identifiziert werden konnte. Da Trypsin auch direkt an der Spleißstelle schneidet, konnte die kovalente Verknüpfung der Exteine auf diese Weise jedoch nicht nachgewiesen werden. Die

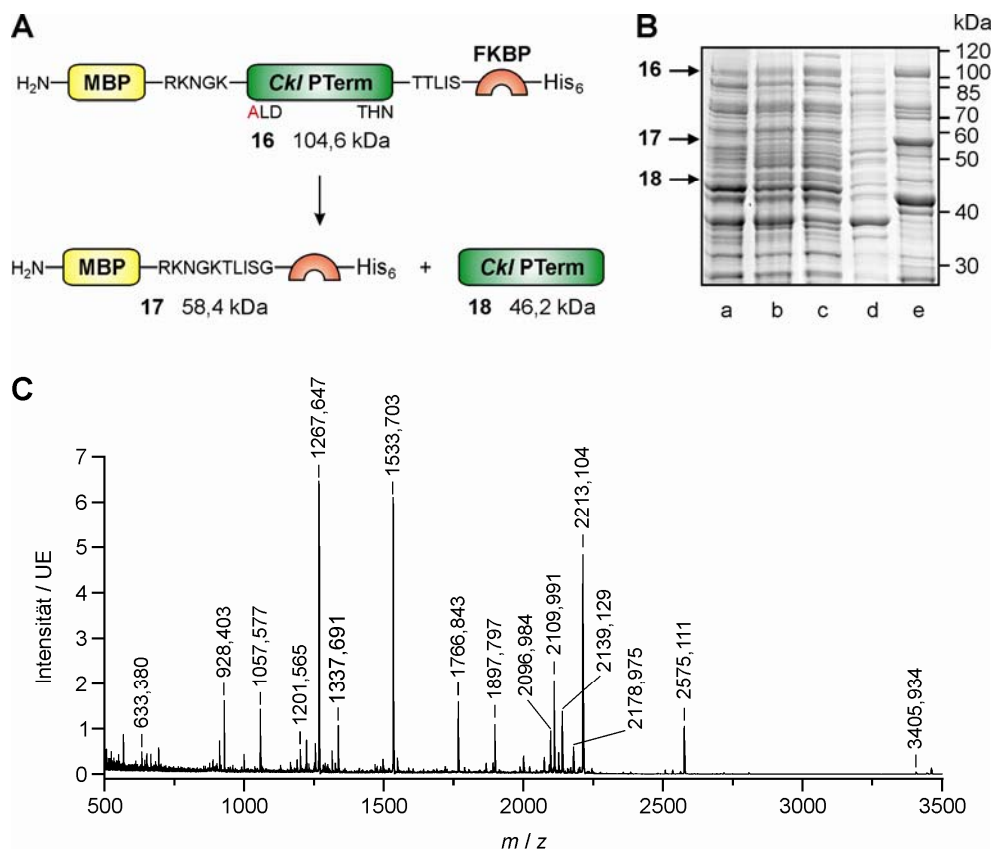


Abbildung 27: Die Protein-Spleißreaktion des *Ckl* PTerm Inteins. (A) Schematische Darstellung der Reaktion. Die jeweils fünf direkt an das Intein angrenzenden Aminosäuren entsprechen nativen Exteinresten. Das Intein trägt an der N-terminalen Spleißstelle ein Alaninrest (rot) und benötigt an der C-terminalen Threonin als Nucleophil. (B) SDS-PAGE Gel der heterologen Expression und affinitätschromatographischen Aufarbeitung (a: vor Induktion, b: 3 h nach Induktion der Überexpression mit IPTG, c: löslicher Teil des Zelllysats, d: unlösliche Zellbestandteile, e: affinitätschromatographisch angereichertes Spleißprodukt **17**). (C) Spektrum der massenspektrometrischen Untersuchung eines tryptischen Verdau des Spleißprodukts **17** mittels MALDI-TOF. Die bezeichneten Signale entsprechen den erwarteten Proteinfragmenten, wobei die Abweichungen von den berechneten Massen unter 1 Da lag.

entsprechende Analyse der Banden im Größenbereich des Vorläuferproteins **16** und des ausgeschnittenen Inteins **18** der Proben nach dreistündiger Induktion mit IPTG sowie nach affinitätschromatographischer Anreicherung (Spuren b und e) ergab keine erwarteten Fragmente. Das ausgeschnittene Intein wurde nicht angereichert, da es keine Histidinsequenz enthält, und war deshalb unter Umständen durch andere Proteinbanden überlagert. Des Weiteren wurde es womöglich direkt im Anschluss an die Reaktion der zellulären Protein-degradation zugeführt. Das Vorläuferprotein hätte dagegen über die Histidinsequenz an das Chromatographiematerial binden können, lag aber wohl nur für kurze Zeit in der Zelle vor, da das Intein vermutlich direkt nach der ribosomalen Protein-Biosynthese die Protein-Spleißreaktion vermittelte und sich selbst aus dem Vorläuferprotein herausschnitt. Anhand der dargestellten Ergebnisse konnte belegt werden, dass das *Ckl* PTerm Intein ein weiteres Beispiel eines Inteins ohne N-terminales Nucleophil darstellt, das dennoch in der Lage ist, die Protein-Spleißreaktion zu vermitteln.

4.2 Fragment-Ligation durch Protein *trans*-Spleißen: Zusammenbau des Porins OmpF mit Hilfe des gespaltenen *Psp*-GBD Pol Inteins

Durch die mittlerweile große Auswahl an experimentell charakterisierten Inteinen hat auch deren Anwendungsbreite in den letzten Jahren enorm zugenommen. Neben diversen *in vivo* Applikationen wurden viele Inteine auf ihre Tauglichkeit für *in vitro* Präparationen von Peptiden und Proteinen unter verschiedenen Bedingungen getestet. Dabei trat die besonders robuste Natur des künstlich gespaltenen *Psp*-GBD Pol Inteins hervor. Das Intein aus dem thermophilen Archaeon *Pyrococcus* sp. GB-D besitzt die Eigenschaft, selbst in Anwesenheit von Harnstoff bis zu einer Konzentration von 7,2 M, die zur Denaturierung der Mehrzahl aller Proteine führt, noch Aktivität zu besitzen. Damit sollte es die viel versprechende Möglichkeit eröffnen, die Protein *trans*-Spleißreaktion auch auf die bedeutende Gruppe der Membranproteine anzuwenden, die zu Zwecken der Solubilisierung ein denaturierendes Milieu benötigen. In diesem Kapitel wird beschrieben, wie es zum ersten Mal gelungen ist, die Protein *trans*-Spleißreaktion für die Präparation eines integralen Membranproteins aus zwei Fragmenten einzusetzen und einen aktiven Ionenkanal zu erhalten.

4.2.1 Konstruktion der Intein-Fusionsproteine

Die Protein *trans*-Spleißreaktion des künstlich geteilten *Psp*-GBD Pol Inteins bei Anwesenheit von denaturierenden Harnstoffkonzentrationen wurde bereits von Perler und Mitarbeitern

beschrieben [52]. Sie konnten zeigen, dass das 537 Aminosäuren umfassende Maxi-Intein zwischen den Resten R440 und K441 in einem Bereich gespalten werden konnte, der der Endonucleasedomäne zugeordnet wurde, ohne dabei seine Spleißaktivität zu verlieren. Dies erforderte jedoch denaturierende Reaktionsbedingungen mit Harnstoffkonzentrationen im Bereich von 3,6 - 7,2 M, ohne die keine Aktivität beobachtet wurde. Das Vorhandensein weiterer Domänen oder überlappender Sequenzen an der Spaltstelle zeigte keinen negativen Einfluss auf das Spleißverhalten. Deletionen von kurzen Sequenzen oder sogar nur einzelner Reste führten dagegen zur völligen Inaktivierung.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden die nachfolgend beschriebenen Fusionsproteine konstruiert, die neben den beiden Inteinhälften jeweils ein Fragment des Zielproteins OmpF enthielten. Als Spaltstelle innerhalb der aus 16 β -Faltblatt-Strängen aufgebauten Fassstruktur von OmpF wurde die in nativer Umgebung zum extrazellulären Raum weisende flexible Schleifenregion L1 (AS 24-39) ausgewählt, die die β -Stränge 1 und 2 verbindet und an deren exponiertester Stelle sich die Aminosäuren Gly26 und Asn27 befinden (Abbildung 18 und Abbildung 28). Ebenfalls in einem zentralen Bereich der Schleife befindet sich an Position 31 ein Serinrest. Anhand dieser strukturellen Daten wurden parallel zwei Konstruktionsstrategien verfolgt. Zum einen war es möglich, Ser31 direkt als essentielles C-terminales Nucleophil für die Spleißreaktion des *Psp*-GBD Pol Inteins auszunutzen, wodurch als Spleißprodukt die native Sequenz von OmpF gebildet wurde. Zum anderen sollte aus Gründen des Einflusses der direkten Umgebung des Inteins auf dessen Spleißaktivität die Aminosäuren LEA und SGL an der N- bzw. C-terminalen Spleißstelle eingeführt werden. Im Kontext dieser flankierenden Reste wurde für das Intein bereits eine hohe Spleißaktivität mit ansonsten heterologen Exteinsequenzen beobachtet [52]. Die Sequenz aus sechs zusätzlichen Aminosäuren (LEASGL) war damit jedoch auch im OmpF-Spleißprodukt als Erweiterung der flexiblen L1 Schleife enthalten.

Entsprechend der ersten Strategie wurde das Konstrukt **19** OmpF(1-30)-*Psp* Pol^N-His₆ bestehend aus den ersten 30 OmpF-Resten, der N-terminalen Inteinhälfte mit den Aminosäuren 1-440 und einer C-terminalen Hexahistidinsequenz hergestellt (Abbildung 28). Die Nummerierung der Aminosäuren von OmpF und des *Psp*-GBD Pol Inteins erfolgen unabhängig voneinander entsprechend den natürlichen Proteinen. Als Reaktionspartner wurde das komplementäre Protein **20** His₁₀-*Psp* Pol^C-OmpF(31-340) konstruiert, das sich aus einer N-terminalen Histidinsequenz, dem C-terminalen Inteinteil mit den Resten 441-537 und der restlichen OmpF-Sequenz mit den Aminosäuren 31-340 mit Serin als Nucleophil an Position 31 zusammensetzte. Zur Realisierung des zweiten Ansatzes wurden die Proteine **21**

OmpF(1-26)-LEA-*Psp* Pol^N-His₆ und **22** His₁₀-*Psp* Pol^C-SGL-OmpF(27-340) konstruiert, die als Exteine neben den vor Position 27 gespaltenen OmpF-Fragmenten noch zusätzlich die Exteinreste LEA bzw. SGL enthielten. In diesem Fall war das essentielle nucleophile Serin Teil der eingeführten SGL Sequenz.

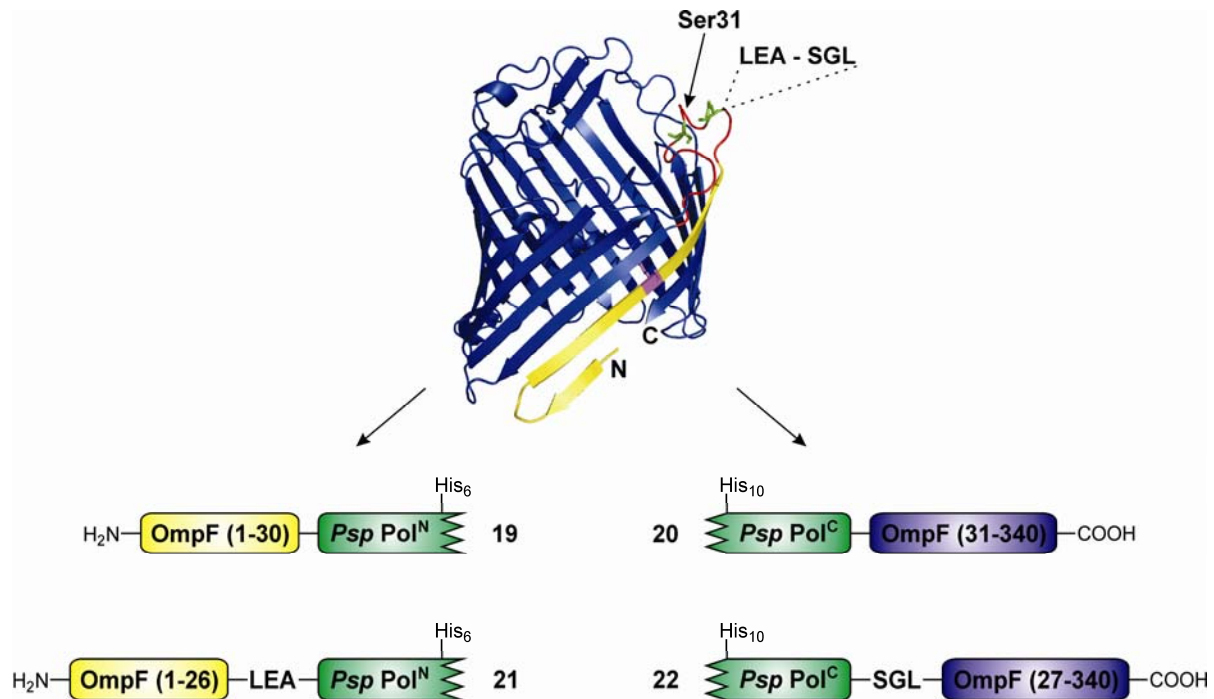


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Fusionsproteine des geteilten *Psp*-GBD Pol Inteins mit den Fragmenten des Porins OmpF. In der oben gezeigten Struktur ist nur ein OmpF Monomer dargestellt. Das N-terminale Fragment ist darin in gelber und das C-terminale in blauer Farbe gezeigt. In der rot gefärbten L1 Schleife liegen die Spaltstellen vor den als grüne Stäbchen dargestellten Resten Asn27 bzw. Ser31. Im ersten Fall wurde Gly26 des N-terminalen OmpF-Fragments mit den nativen Exteinresten LEA und Asn27 des C-terminalen Fragments mit SGL fusioniert, die die Spleißaktivität der Inteinhälften *Psp* Pol^N (AS 1-440) und *Psp* Pol^C (AS 441-537) erhöhen sollten. Lys16 (violet) liegt in der Mitte des N-terminalen OmpF-Fragments und ragt auf Höhe der Porenverjüngung in die Pore hinein, was in späteren Kapiteln von Bedeutung ist (PDB-Datei: 2omf).

4.2.2 Präparation von OmpF aus zwei Fragmenten durch Protein *trans*-Spleißen

Die Präparation aktiver OmpF-Trimere aus anfänglich zwei getrennten Fragmenten erfolgte in mehreren Schritten, die in den Kapiteln 3.2 und 3.4 detailliert beschrieben sind. Zunächst wurden die Konstrukte **19-22** in einem Porin-defizienten *E. coli* Stamm exprimiert, als unlösliche Einschlusskörper (*inclusion bodies*) gereinigt und in Harnstoffpuffer mit einer Harnstoffkonzentration von 6 M solubilisiert. Zur Initiierung der Protein *trans*-Spleißreaktion wurden die komplementären Konstrukte gemischt und über Nacht zunächst bei niedrigen Temperaturen inkubiert, bevor die Reaktionstemperatur von 37 °C eingestellt wurde. Nach Reaktion über Nacht wurden die Spleißprodukte **23** und **28** mittels Ni²⁺-NTA-Affinitäts-

chromatographie gereinigt, wobei ausgenutzt wurde, dass alle Ausgangskonstrukte und Reaktionsprodukte mit Ausnahme der Spleißprodukte eine Histidinsequenz (His₆ oder His₁₀, siehe Abbildung 29 und Abbildung 30) trugen. Danach wurden die Spleißprodukte konzentriert und durch Verdünnung in eine Dispersion aus kleinen unilamellaren Vesikeln bestehend aus 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) und Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) zur trimeren OmpF-Pore zurückgefaltet. Das gereinigte OmpF-Trimer konnte schließlich aufgrund seiner ausgeprägten Stabilität gegenüber den Bedingungen der SDS-PAGE nach elektrophoretischer Trennung durch Gelextraktion mit Hilfe von *n*-Octylpolyoxyethylen (OPOE) erhalten werden. Die Resultate der Präparationsschritte sind in den SDS-PAGE-Gelen von Abbildung 29 und Abbildung 30 dargestellt und werden nun im Einzelnen vorgestellt.

Die Präparation der nativen OmpF-Sequenz **23**, produziert durch die Protein-Spleißreaktion der Proteine **19** und **20**, ist in Abbildung 29 zu sehen. Beide Ausgangskonstrukte konnten in ausreichend reiner Form erhalten werden und zeigten ohne den jeweiligen Reaktionspartner auch nach wenigen Tagen keine Tendenz zu ungewollten Spaltungsreaktionen oder unspezifischer Degradation (Spuren a und b). Die Löslichkeit des N-terminalen Konstrukts **19** in Harnstoffpuffer limitierte die Reaktantenkonzentration auf etwa 40 μ M. Dabei kamen von jedem Ausgangskonstrukt etwa 11 bzw. 10 mg (je 200 nmol) zum Einsatz, die für Konstrukt **19** aus 2 l Expressionskultur und für **20** aus etwa 1 l gewonnen wurden. Die Protein *trans*-Spleißreaktion führte mit einer Ausbeute von 10-15 % über Nacht zur Bildung einer neuen Proteinbande, die der erwarteten Größe des Spleißprodukts **23**, das die vollständige native OmpF-Sequenz umfasste, mit einem berechneten Molekulargewicht von 37,1 kDa entsprach (Spur c). Längere Reaktionszeiten ergaben keine höheren Umsätze und führten hingegen zur partiellen Präzipitation der Proteine. Die ebenfalls während der Reaktion entstandenen Inteinhälften **24** und **25** konnten auf dem gezeigten SDS-Gel nicht aufgelöst werden, da der geringe Größenunterschied der Proteine **20** und **24** zu einer gemeinsamen Bande führte und das Protein **25** zu klein war, so dass es nicht mehr im Trennbereich des Gels lag. Die letztgenannte Inteinhälfte konnte jedoch auf SDS-Gelen mit angepasstem Trennvermögen eindeutig zugeordnet werden (nicht gezeigt). Zur weiteren Identifizierung wurde das Spleißprodukt **23** mit zwei Referenzproteinen verglichen. Zum einen wurde OmpF mit nativer Sequenz (**26**) sowie die verkürzte Version OmpF(27-340) N27C (**27**) auf rekombinante Weise hergestellt [181]. Das Protein **26** setzte sich aus der gleichen Aminosäuresequenz wie Spleißprodukt **23** zusammen, während das verkürzte Konstrukt **27** mit 34,2 kDa eine ähnliche Größe wie das potentiell durch C-terminale Spaltung

entstehende Fragment OmpF(31-340) mit 33,8 kDa besaß. Die C-terminale Spaltung der Peptidbindung zwischen Intein und C-Extein ist eine oft beobachtete Nebenreaktion des Protein-Spleißens. Wie in Abbildung 29 ersichtlich besaßen die Proteine **23** und **26** aufgrund ihrer identischen Sequenz auch die gleiche elektrophoretische Mobilität (Spuren h und j). Zudem konnten die Banden des Spleißprodukts **23** und des verkürzten Konstrukts **27** deutlich voneinander getrennt werden, weshalb das Auftreten der Nebenreaktion ausgeschlossen wurde (Spuren i und j). Über die N-terminale Spaltungsreaktion konnte dagegen keine Aussage getroffen werden, da das potentielle Spaltungsprodukt OmpF(1-30) mit 3,3 kDa sehr klein und mittels SDS-PAGE nicht detektierbar wäre. Bei der massenspektrometrischen Analyse eines Trypsin-Verdauers der Gelbande des Spleißprodukts **23** mittels MALDI-TOF konnte das Fragment, das die kovalente Verknüpfung von N- und C-Extein eindeutig belegt hätte, neben anderen OmpF-Fragmenten wahrscheinlich aufgrund mangelnder Ionisierbarkeit nicht detektiert werden. Die dargestellten Ergebnisse zusammen mit der in den Kapiteln 4.2.3 und 4.2.4 beschriebenen Rückfaltbarkeit des Spleißprodukts und dem Verhalten als Ionenkanal belegen dennoch eindeutig die erfolgreiche Produktion des kompletten OmpF-Porins aus zwei Fragmenten mittels der Protein *trans*-Spleißreaktion.

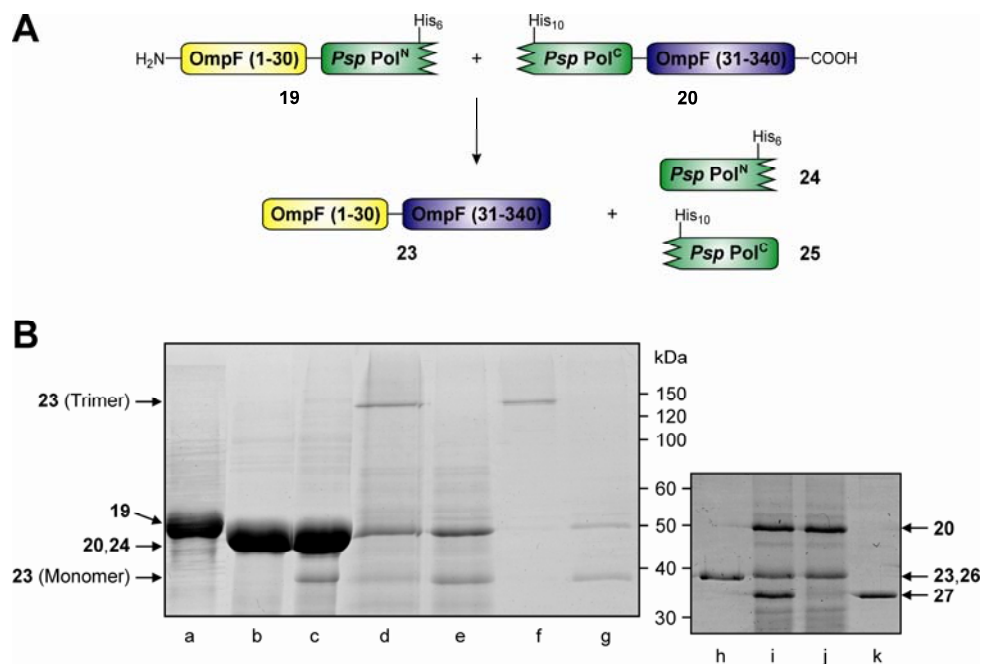


Abbildung 29: Präparation von OmpF aus zwei Fragmenten mittels Protein *trans*-Spleißen und Rückfaltung. (A) Schematische Darstellung der Protein-Spleißreaktion (**19**: 54,8 kDa, **20**: 47,8 kDa, **23**: 37,1 kDa, **24**: 51,6 kDa, **25**: 14,1 kDa). (B) SDS-PAGE Gel der Präparation (a: **19**, b: **20**, c: Protein-Spleißreaktion von **19** und **20**, d: Rückfaltungsansatz des gereinigten Spleißprodukts **23**, e: durch Hitze denaturierter Rückfaltungsansatz, f: geextrahierte OmpF-Trimere, g: Probe aus Spur f nach Denaturierung, h: rekombinant hergestelltes OmpF **26**, i: Mischung der Proben aus den Spuren j und k, j: denaturierter Rückfaltungsansatz des OmpF-Spleißprodukts **23**, k: Referenz **27** (34,2 kDa) mit einer ähnlichen Größe wie das potentielle C-terminale Spaltungsprodukt OmpF(31-340) mit 33,8 kDa; die Proteine **23** und **26** (37,1 kDa) besitzen dieselbe Primärsequenz).

Die Reaktion der Proteine **21** und **22**, die durch die drei zusätzlichen Exteinamino-säuren unterstützt wurde, verlief wie in Abbildung 30 dargestellt auf sehr ähnliche Weise. In diesem Fall wurde das Spleißprodukt **28**, das sich aus der OmpF-Sequenz mit der Insertion der Reste LEASGL zwischen den Resten Gly26 und Asn27 zusammensetzte, mit deutlich höheren Ausbeuten von 30-40 % gebildet (Spuren a und b). Die weiteren Produkte **24** und **25** konnten durch das gezeigte Gel wie oben erwähnt nicht separiert werden. Interessanterweise war der Einfluss der Exteinsequenzen auf die Spleißaktivität des *Psp*-GBD Pol Inteins bei der C-terminalen Inteinhälfte besonders ausgeprägt. Kreuzkombinationen der Konstrukte **19** und **22** sowie **21** und **20** zeigten, dass die Spleißausbeuten unabhängig von den N-terminalen Proteinen ausschließlich durch die C-terminalen Konstrukte bestimmt wurden. So reagierte Protein **20** sowohl mit **19** also auch mit **21** mit einem Umsatz von 10-15 %, während **22** mit beiden N-terminalen Konstrukten Ausbeuten von 30-40 % erzielte (nicht gezeigt). Insgesamt stellten die relativ geringen Ausbeuten bei der Präparation von OmpF keine ernsthafte Limitation dar, da die einfache und günstige Herstellung der Ausgangskonstrukte sowie der geringe Proteinbedarf zur elektrophysiologischen Analyse von Ionenkanälen damit sehr gut vereinbar waren.

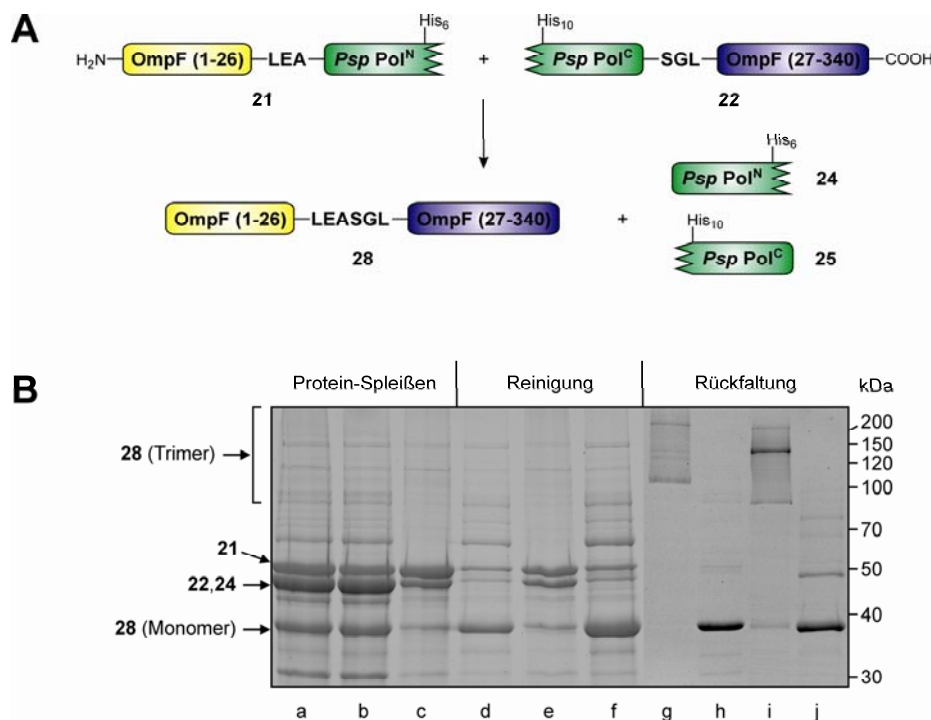


Abbildung 30: Präparation des OmpF-Derivats mit Insertion der Reste LEASGL. (A) Illustration der Protein *trans*-Spleißreaktion (**21**: 54,7 kDa, **22**: 48,5 kDa, **28**: 37,7 kDa, **24**: 51,6 kDa, **25**: 14,1 kDa). (B) SDS-PAGE Gel der einzelnen Präparationsschritte (a: Protein-Spleißreaktion von **21** und **22**, b: löslicher Anteil des Reaktionsansatzes aus Spur a, c: Präzipitat der Reaktion von **21** und **22**, d: gereinigtes Spleißprodukt **28**, e: affinitätschromatographisch abgetrennte Proteine, f: konzentriertes Spleißprodukt **28**, g: Rückfaltungsansatz von **28**, h: durch Hitze denaturierter Rückfaltungsansatz, i: durch Gelextraktion gereinigte Trimere, j: denaturierte Probe aus Spur i)

Überdies ist in Abbildung 30 exemplarisch der Erfolg der Reinigung von Spleißprodukt **28** dargestellt. Da es als einzige Komponente keine Histidinsequenz enthielt, konnten alle weiteren Proteine mittels Ni^{2+} -NTA-Chromatographie in weiten Teilen abgetrennt werden (Spuren d und e). Durch einen Konzentrationsschritt wurde gereinigtes Spleißprodukt erhalten (Spur f), das direkt zur Rückfaltung in einer Suspension aus Lipid-Vesikeln eingesetzt werden konnte. Die Aufarbeitung von Spleißprodukt **23** verlief in gleicher Weise, mit dem einzigen Unterschied, dass das Produkt in geringeren Konzentrationen erhalten wurde.

4.2.3 Rückfaltung und Reinigung der trimeren OmpF-Pore

Das Zielprotein OmpF bildet in natürlicher Umgebung einen unspezifischen Kanal zur Diffusion von kleinen gelösten Ionen und Metaboliten über die äußere Membran von *E. coli*. Als integrales Membranprotein enthält OmpF besonders in den die Membran durchspannenden Sequenzbereichen einen hohen Anteil an Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten. Diese Anhäufung hydrophober Sequenzen würde außerhalb einer Lipiddoppelschicht dazu führen, dass die Proteine zur Minimierung der Kontaktfläche ihrer hydrophoben Bereiche mit der wässrigen Umgebung Aggregate bildeten, die ab einer bestimmten Größe anfangen zu präzipitieren. Deshalb sind zur Extraktion oder Solubilisierung von Membranproteinen amphiphile Additive notwendig, die hydrophobe Regionen von Proteinen in den Kernbereich der von ihnen gebildeten Mizellen einschließen und dadurch die Aggregation der Proteine verhindern. Dagegen können chaotrope Agenzien in hohen Konzentrationen hydrophobe Proteine durch vollständige Entfaltung und Bindung an die Polypeptidkette in eine lösliche Form überführen. Zur Rückfaltung solcher in ungefalteter Form präparierter Proteine kommen häufig aus Lipiden aufgebaute Vesikel (Liposome, *small unilamellar vesicles*) zum Einsatz, die eine Doppelschicht ähnlich einer natürlichen Membran ausbilden. Viele Porine besitzen die Möglichkeit, in mehreren Stufen in solche Lipiddoppelschichten zu insertieren und dabei ihre native Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen wieder auszubilden [168,190,194]. Im rückgefalteten Zustand können sie schließlich aus den Vesikeln mit Hilfe von Detergens-Mizellen herausgelöst oder mit Membranen verschmolzen werden.

Die zur Rückfaltung der homotrimeren OmpF-Poren verwendeten Vesikel setzten sich zu gleichen Teilen aus dem Phospholipid 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin und dem Detergens Dodecyl- β -D-maltosid zusammen. Durch Behandlung mit Ultraschall bildeten sich in einem Phosphatpuffer mit pH 7,3 kleine unilamellare Vesikel [168,190]. Nach Zugabe der gereinigten Spleißprodukte oder rekombinant hergestellter OmpF-Proben wurde die

Rückfaltung der nativen trimeren Struktur über Nacht realisiert. Eine erfolgreiche Rückfaltung konnte anhand einer neu entstandenen diskreten Bande oder einer leiterförmigen Bandenfolge in SDS-Gelen im Größenbereich der OmpF-Trimere (111,3 kDa) verfolgt werden. Wie in den Spuren d und e der Abbildung 29 und Spuren g und h der Abbildung 30 zu erkennen ist, können diese während der SDS-PAGE stabilen Trimere durch Erhitzen auf 95 °C wieder denaturiert werden [191]. Das Verschwinden der Trimerbande nach Denaturierung diente deshalb als erster Beweis der intakten trimeren Struktur. Durch Vergleich der Intensitäten von Monomer- und Trimerbande wurde eine Rückfalteffizienz für Spleißprodukt **23** von etwa 70 % abgeschätzt. Die Rückfaltung von **28** verlief noch effizienter und ergab trimere OmpF-Derivate mit mindestens 90 % Umsatz und in höherer Konzentration. Die Erweiterung der flexiblen L1 Schleife durch die Reste LEASGL schien demnach die Ausbildung der stabilen trimeren β -Fass-Struktur nicht negativ zu beeinflussen. Das Auftreten der leiterförmigen Bandenmuster der rückgefalteten Proben kam wahrscheinlich durch Assoziation kontaminierender Lipopolysaccharide zustande, die während der Präparation nicht vollständig entfernt werden konnten [167,194].

Obwohl während des Verdünnungsschritts in die Vesikelsuspension ein bedeutender Anteil der nicht rückfaltbaren Proteine aufgrund der herabgesetzten Harnstoffkonzentration bereits präzipitiert und abgetrennt worden war, enthielt der Ansatz der rückgefalteten Trimere immer noch restliches Ausgangsmaterial, monomeres Spleißprodukt sowie uncharakterisierte Hintergrundkontaminationen. Um eine weitere Reinigung zu erreichen, wurden die OmpF-Trimere mittels SDS-PAGE von den Verunreinigungen abgetrennt und mit Hilfe des mizellenbildenden Rosenbusch-Tensids *n*-Octylpolyoxyethylen (OPOE) aus den ausgeschnittenen Gelbanden extrahiert. Das Ergebnis des Extraktionsschritts zeigen die Spuren f und g der Abbildung 29 sowie die Spuren i und j der Abbildung 30. Nach einer Methode zur Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA) wurden OmpF-Konzentrationen von 3-10 μ M erhalten. Auf die beschriebene Weise konnten demnach routinemäßig 50-300 μ g OmpF-Porin präpariert werden. Die ermittelten Konzentrationen lagen allerdings in der Nähe der unteren Detektionsgrenze der Methode, so dass mögliche Fehler durch Kontaminationen besonders ins Gewicht fallen würden. Neben kleineren Hintergrundkontaminationen fielen stets Reste von monomerem OmpF auf, das sich allerdings auch während der SDS-PAGE zum Teil entfaltet haben könnte. Bemerkenswert sind zudem die Reste der Ausgangskonstrukte **20** bzw. **22**, die in den Proben intakter Trimere nicht zu finden sind und erst nach Hitzedenaturierung auftreten. Dies deutete darauf hin, dass die Proteine unter Umständen über die enthaltenen, relativ großen C-terminalen OmpF-Fragment in Form möglicher Faltungs-

intermediate in die Vesikel inseriert oder zumindest assoziiert vorlagen, so dass sie während der SDS-PAGE das gleiche elektrophoretische Verhalten zeigten, wie die zurückgefalteten trimere OmpF-Poren. Diese Konstrukte waren separat jedoch nicht in der Lage, trimere Strukturen zu bilden, weshalb eventuelle störende Effekte bei der anschließenden Ionenkanalanalyse ausgeschlossen wurden (nicht gezeigt).

Zur weiteren Bestätigung der strukturellen Integrität des rückgefalteten Porins wurde der zirkuläre Dichroismus (CD) des Spleißprodukts **23** mit dem des rekombinanten Referenzproteins **26** verglichen. Die Konstrukte **23** und **26** sind identische Proteine, die aber auf verschiedene Weise präpariert wurden. Zur Verbesserung der Spektrenqualität wurden die entsprechenden Rückfaltungsansätze mit Trypsin verdaut und das gegen Proteasen resistente OmpF-Trimer über Anionenaustausch-Chromatografie in gereinigter Form erhalten (Abbildung 31B, [195]). Das in Abbildung 31C dargestellte CD Spektrum der Referenz **26** besaß die erwartete und bereits dezidiert in der Literatur beschriebene Form für die aus β -Fässern aufgebaute OmpF-Pore mit einem Minimum bei 219 nm und einem Maximum im fernen UV-Bereich bei 197 nm [196,197]. Im Einklang damit zeigte das Spektrum des Spleißprodukts **23** eine fast kongruente Form mit einem übereinstimmenden Minimum bei 219 nm. Der Bereich unterhalb von 200 nm konnte wahrscheinlich wegen zu geringer Konzentration oder potentieller Kontaminationen nicht in ausreichender Qualität detektiert werden.

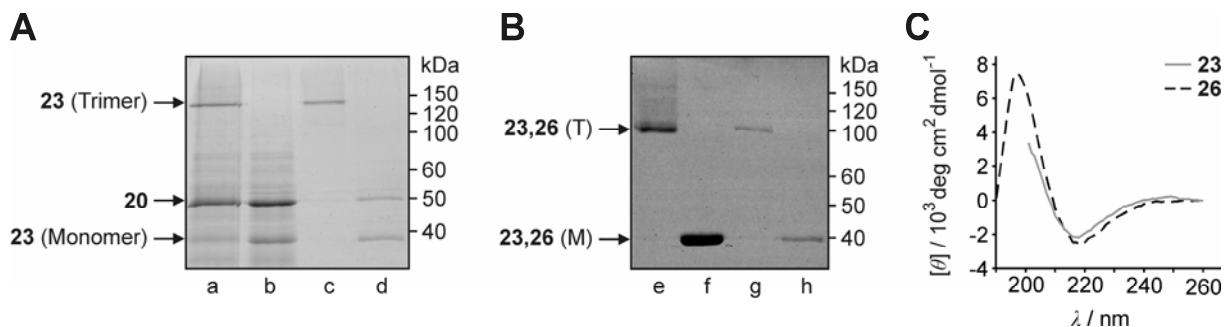


Abbildung 31: Eigenschaften des OmpF-Trimers. (A) SDS-PAGE Gel der Rückfaltung und Gelextraktion der trimere OmpF-Pore (a: Rückfaltungsansatz des Spleißprodukts **23**, b: denaturierter Rückfaltungsansatz, c: geextrahiertes Trimer **23**, d: geextrahierte Probe nach Hitzedenaturierung; **20**: His₁₀-Psp Pol^C-OmpF(31-340)). Das berechnete Molekulargewicht des Trimers beträgt 111,3 kDa. (B) SDS-PAGE Gel von OmpF mit nativer Sequenz nach Reinigung der Trimere durch Trypsinverdau und Anionenaustausch-Chromatographie (e und f: rekombinant hergestelltes OmpF **26**, g und h: Spleißprodukt **23**). (C) Spektren des zirkulären Dichroismus (CD) der trimere Proben aus B.

4.2.4 Elektrophysiologische Bestimmung der Ionenkanalaktivität

Die rückgefalteten trimere OmpF-Poren wurden schließlich auf ihre Funktionalität als Ionenkanäle getestet. Zu diesem Zweck wurden elektrophysiologische Messungen einzelner

Kanäle in einer *Black Lipid Membrane* (BLM) gemäß Kapitel 3.4.9 durchgeführt. Bei diesem Verfahren standen zwei mit gepufferter KCl-Lösung gefüllte Reservoirs nur durch eine 0,2 mm kleine Öffnung in Kontakt, die jedoch von einer Lipidmembran überspannt war. Diese Trennung der beiden Kammern bewirkte, dass beim Anlegen einer elektrischen Spannung über die Membran nur in minimalem Umfang Ladungen ausgetauscht werden konnten. Erst der Einbau eines Ionenkanals in die planare Lipiddoppelschicht löste einen stufenartigen Anstieg der Stromstärke aus, der auf den nun ermöglichten Ionenfluss durch die trimere Pore zurückgeführt wurde. Durch eine hohe Verdünnung der OmpF-Poren während der Zugabe in die Messapparatur war es möglich, Messungen von einzelnen trimeren Kanälen durchzuführen und auf diese Weise ihr Öffnungs- und Schließverhalten zu beobachten und zu quantifizieren.

Zur Etablierung einer praktikablen Messmethode wurde zunächst natives trimeres OmpF aus der äußeren Membran von *E. coli* extrahiert [181], das nach Überexpression mit N-terminaler Signalsequenz den natürlichen Sec-Translokationsweg durch die innere Membran und das Periplasma zu seinem Zielort genommen hatte. Diese nativen Poren wurden als Referenz für alle durchgeführten elektrophysiologischen Messungen benutzt. Die in Abbildung 32 beispielhaft dargestellte Stromspur einer Einzelkanalmessung zeigte das charakteristische Verhalten des OmpF-Ionenkanals [162]. Ein sprunghafter Anstieg der Stromstärke ausgehend von der stabilen Grundlinie (G) auf einen Wert von 157 pA bei einer angelegten Spannung von 140 mV belegte den Einbau bzw. das gleichzeitige Öffnen von drei Monomeren innerhalb eines einzelnen Trimers (G→O3). Nach einer typischen Öffnungszeit im Bereich einiger Sekunden bei konstanter Stromstärke konnten die Schließereignisse der einzelnen Monomere durch einen stufenförmigen Stromabfall um 50 pA (O3→O2), 51 pA (O2→O1) und 55 pA (O1→G) also um je etwa ein Drittel des Öffnungsniveaus verfolgt werden. Im vollständig geschlossenen Zustand blieb ein restlicher, leicht über der Grundlinie liegender Stromfluss erhalten. Jeder Öffnungszustand wurde dabei durch ein diskretes

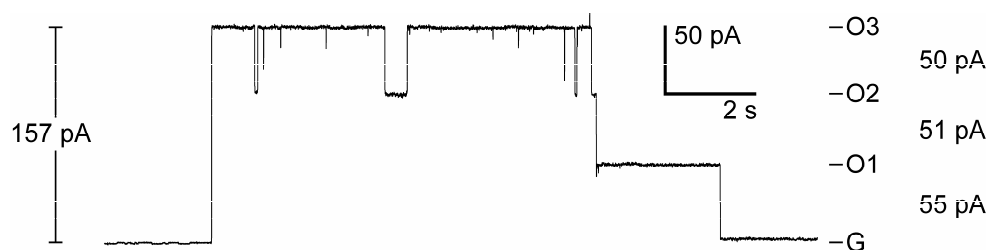


Abbildung 32: Typische Stromspur eines einzelnen aus der *E. coli* Membran extrahierten OmpF-Trimers nach dem BLM Verfahren. Die Markierungen auf der rechten Seite bezeichnen die Anzahl der offenen Monomere, während die Zahlenwerte die Änderungen der Stromstärke durch Monomerschließungen angeben. Links ist der Wert für die Trimeröffnung dargestellt. Die Messung wurde bei 140 mV durchgeführt.

Stromniveau abgebildet (G, O1, O2 und O3). Neben den beschriebenen Schließereignissen wurde auch das erneute Öffnen eines bereits geschlossenen Monomers ($O3 \rightarrow O2 \rightarrow O3$) beobachtet, wobei nach dem Öffnen wieder das Stromniveau erreicht wurde, von dem der vorangegangene Schließvorgang ausgegangen war. Die Messungen wurden mit 140 mV in einem Bereich oberhalb der kritischen Spannung der OmpF-Kanäle durchgeführt, in dem die Wahrscheinlichkeit eines Schließereignisses größer wurde als die einer erneuten Kanalöffnung (siehe Kapitel 5.3). Dies war notwendig, um nach einer Trimeröffnung alle drei Monomerschließungen beobachten zu können, bevor sich weitere Kanäle in die Membran einbauten. Aus den Stromstärkedekrementen infolge der Schließereignisse jedes einzelnen Monomers konnten quantitative Informationen über deren Leitungseigenschaften gewonnen werden, die zum quantitativen Vergleich verschiedener OmpF-Poren und deren Derivate herangezogen wurden. Qualitativ wurde zunächst das Auftreten von Stromspuren mit einem ähnlichen wie dem eben beschriebenen Verlauf des Referenzproteins als eindeutiger Nachweis für das Vorliegen eines intakten, aus einer trimeren OmpF-Pore aufgebauten Ionenkanals gewertet.

Zum Vergleich mit der nativen, membran-extrahierten OmpF-Referenz wurde die durch Protein *trans*-Spleißen hergestellte Pore **23** ebenfalls elektrophysiologisch untersucht. Abbildung 33 stellt die Resultate für die OmpF-Referenz (A) denen des Spleißprodukts mit nativer Aminosäuresequenz (B) gegenüber, die eine Auswahl der erhaltenen Stromspuren widerspiegeln. Augenscheinlich zeigten der native Kanal und das Spleißprodukt ein sehr ähnliches Verhalten. Bei genauerer Betrachtung konnte in den Spuren A3 und B3 das mehrfache Öffnen und Schließen einzelner Monomere verfolgt werden, während in Spur A2 das Flackern eines Monomers zwischen dem offenen und geschlossenen Zustand im Bereich von einigen Millisekunden ($O2 \rightarrow O1$) auftrat. Im weiteren Verlauf von Spur A2 ist nach dem Erreichen des geschlossenen Niveaus ein erneutes gleichzeitiges Öffnen von zwei Kanälen ($G \rightarrow O2$) zu beobachten. In ähnlicher Weise fand während der Messung von Spur A3 ein sehr kurzes Flackern zwischen dem geschlossenen und vollständig geöffneten Zustand ($G \rightarrow O3$) statt. Dies deutete darauf hin, dass Öffnungs- und Schließereignisse auch konzertiert ablaufen konnten. Die Öffnungszeiten der einzelnen Monomere innerhalb einer Messung wie auch im Vergleich verschiedener Messreihen unterschieden sich zum Teil erheblich und ließen keinerlei Tendenzen erkennen, weshalb dieser Parameter zur Interpretation der Kanalaktivität ungeeignet war. Die quantitative Auswertung der Stromstärkeabnahme als Folge eines Monomerschließereignisses innerhalb isolierter Trimere ergab schließlich für den nativen Referenzkanal ein durchschnittliches Dekrement von $51,2 \pm 3,0$ pA, während die Analyse von

Spleißprodukt **23** einen sehr ähnlichen Wert von $54,5 \pm 3,4$ pA lieferte (Abbildung 33C). Mit einer angelegten Spannung von 140 mV wurde daraus gemäß Gl. 9 ein elektrischer Leitwert von 366 ± 21 pS bzw. 389 ± 24 pS je Monomer abgeleitet, die sich in guter Übereinstimmung mit der Literatur befanden (313 pS in [169]). Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass durch Protein *trans*-Spleißen und Rückfaltung von Spleißprodukt **23** eine intakte OmpF-Pore präpariert werden konnte, die eine vergleichbare Aktivität als Ionenkanal besaß wie ein natürlicher Referenzkanal. Auf diese Weise konnte zum ersten Mal ein aktives integrales Membranprotein mit Hilfe der Protein *trans*-Spleißreaktion aus zwei Fragmenten wiederhergestellt werden.

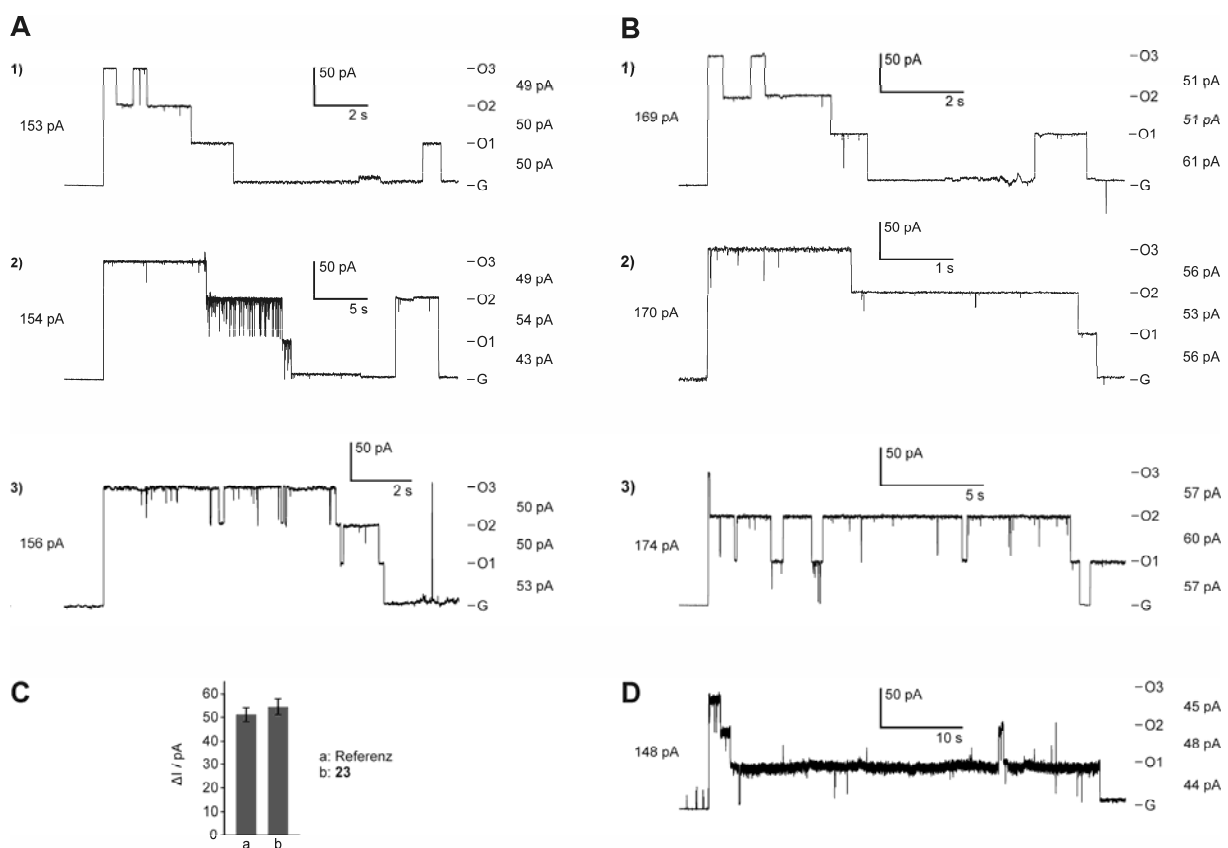


Abbildung 33: Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften der OmpF-Poren mit nativer Sequenz. (A) Stromspuren von Einzelkanalmessungen der nativen, als Trimer aus der Membran von *E. coli* extrahierten Referenz. (B) Elektrophysiologie des Spleißprodukts **23**. (C) Quantitative Auswertung der Stromstärke-dekremente von Monomerschließereignissen innerhalb einzelner Trimere (a: Referenz, OmpF aus Membran extrahiert; b: **23**, OmpF-Spleißprodukt mit nativer Sequenz). (D) Beispielhafte Stromspur des OmpF-Derivats **28** (OmpF(1-26)-LEASGL-OmpF(27-340), Spleißprodukt). Alle Spuren wurden auf eine einheitliche Stromstärke-skala normiert.

Die Analyse des OmpF-Derivats **28**, das gleichermaßen durch Protein-Spleißen gebildet wurde und die zusätzliche Aminosäuresequenz LEASGL an der Spleißstelle enthielt, gestaltete sich als äußerst schwierig, da während der BLM-Messungen nur sehr geringe Einbauraten in die Lipidmembran erzielt wurden, die zu Stromspuren mit wesentlichen

Störeffekten und weniger stabilen Leitniveaus führten. Dennoch konnte in Abbildung 33D das erwartete Öffnungs- und Schließverhalten der einzelnen Monomere eindeutig beobachtet werden, wobei die wenigen erhaltenen Stromstärkedekremente weitgehend im Bereich des nativen Porins lagen. Diese Präparationsstrategie führte demnach gleichermaßen zu aktiven Derivaten des OmpF-Kanals, die hingegen in einem vertretbaren Zeitrahmen nicht vollständig quantitativ analysiert werden konnten.

Zusammenfassend konnte auf anschauliche Weise belegt werden, dass die Protein *trans*-Spleißreaktion des künstlich gespaltenen *Psp*-GBD Pol Inteins erfolgreich zur Ligation unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt werden konnte, um den Ionenkanal OmpF aus zwei Fragmenten zusammenzusetzen. Die Rückfaltbarkeit und elektrophysiologische Analyse belegten zudem die Funktionalität der trimeren Pore. Damit wurde die Grundlage geschaffen, um die Protein *trans*-Spleißreaktion in Verbindung mit Biokonjugationsmethoden als Werkzeug zur Präparation semisynthetischer Ionenkanäle einzusetzen.

4.3 Konstruktion eines modifizierten Ionenkanals

Mit der Verfügbarkeit eines etablierten Verfahrens zur Ligation von Proteinfragmenten des Porins OmpF sowie zur anschließenden Gewinnung aktiver Ionenkanäle sollten nun die Vorteile der anfänglich separaten Präparation der Fragmente ausgenutzt werden. Die Separation eröffnet prinzipiell die Möglichkeit, beide Fragmente mit unterschiedlichen Modifikationen zu versehen oder eine regioselektive Adressierung eines einzelnen Rests in einem Fragment neben weiteren unter Umständen essentiellen Resten des anderen zu erreichen. Im Folgenden wird die Kombination mit der chemoselektiven Konjugation eines eingeführten Cysteins zur Herstellung eines semisynthetischen Ionenkanals aus zwei Fragmenten auf der Basis des OmpF-Porins beschrieben.

4.3.1 Strategie zur chemo- und regioselektiven Modifikation des OmpF-Kanals

Mit den Methoden der Biokonjugationschemie ist es möglich, die Seitenketten einzelner Aminosäuren innerhalb eines Peptids oder Proteins neben allen weiteren proteinogenen Resten auf chemoselektive Weise zu modifizieren. Wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, kommt dabei besonders häufig die Sulfhydrylgruppe der Cystein-Seitenkette zum Einsatz. Die Kopplung dieser Technik mit der Protein *trans*-Spleißreaktion der *Ssp* DnaB und *Mxe* GyrA Inteine konnte bereits bei der Etablierung der Cys-Tag-Technologie ausgenutzt werden (Kapitel 1.2.3). Dabei wurde ein Cystein als Teil einer exogenen Cys-Tag-Sequenz chemo-

selektiv modifiziert und auf ein Zielprotein mit weiteren Cysteinresten übertragen, so dass im Hinblick auf das gesamte Spleißprodukt eine chemo- sowie regioselektive Modifikation erreicht wurde. Um diese Kopplung zu ermöglichen, ist es indes notwendig, dass die eingesetzten Inteinhälften selbst keine Cysteine enthalten. Da die Mehrzahl der Inteine jedoch zumindest an einer Spleißstelle auf das Vorhandensein eines essentiellen Cysteins angewiesen ist, ist das gespaltene *Psp*-GBD Pol Intein in mehrerer Hinsicht von besonderer Bedeutung. Denn neben der ausgesprochen robusten Natur und Aktivität bei hohen Harnstoffkonzentrationen benutzt es Serin als essentielle nucleophile Aminosäure an beiden Spleißstellen und ist deshalb prinzipiell mit Cystein-Modifikationen sowohl innerhalb des N-terminal als auch des C-terminal fusionierten Fragments des Zielproteins vereinbar. Die einzige Einschränkung ist dabei ein Cystein an Position 351 der N-terminalen Inteinhälfte, das im Bereich der Endonucleasedomäne zu finden ist. Durch eine geeignete Substitution gegen Alanin konnte, wie weiter unten ausgeführt wird, ein Intein erhalten werden, dessen Sequenz frei war von Cysteinresten und dessen Spleißaktivität durch die Mutation zwar beeinflusst wurde aber dennoch präparativ nutzbar blieb.

Das Zielprotein OmpF enthält dagegen in seiner nativen Primärsequenz keine Cysteinreste, so dass diese an ausgewählter Stelle sowohl in den N- als auch in den C-terminalen Fragmenten durch Punktmutagenese eingeführt werden können. Anhand der strukturellen Daten wurde zu diesem Zweck ein Lysin an Position 16 identifiziert, das im zentralen Bereich des ersten die Membran komplett durchspannenden β -Faltblattstrangs liegt (Abbildung 28 und Abbildung 34). Seine Seitenkette ragt gegenüber der Schleife L3 etwa auf der Höhe der größten Verjüngung von der Wand in das Innere der Pore. Nach Substitution durch Cystein sollte deshalb eine eingeführte Modifikation an dieser Stelle ebenfalls in das Porenlumen weisen und gegebenenfalls zu einer noch ausgeprägteren Kanalverengung führen. Als Anknüpfungspunkt innerhalb des C-terminalen OmpF-Fragments wurde Gly119 ausgewählt. Dieser Rest an der dem Lumen zugewandten Seite der Schleife L3 zeigte bereits in Mutationsstudien einen ausgeprägten Einfluss auf die Leitungseigenschaften der OmpF-Pore [198]. Aus praktischen Gründen lag der Fokus jedoch zunächst auf der Modifikation von Cys16 des N-terminalen OmpF-Fragments.

Mit diesen Voraussetzungen wurde die in Abbildung 34 veranschaulichte Syntheseroute entworfen, die eine Reaktionssequenz aus Cystein-Modifikation, Protein *trans*-Spleißen und Rückfaltung des Spleißprodukts beinhaltete. Zunächst wurde ausgehend von Konstrukt **21** durch die Mutationen K16C im N-terminalen OmpF-Fragment und C351A in der

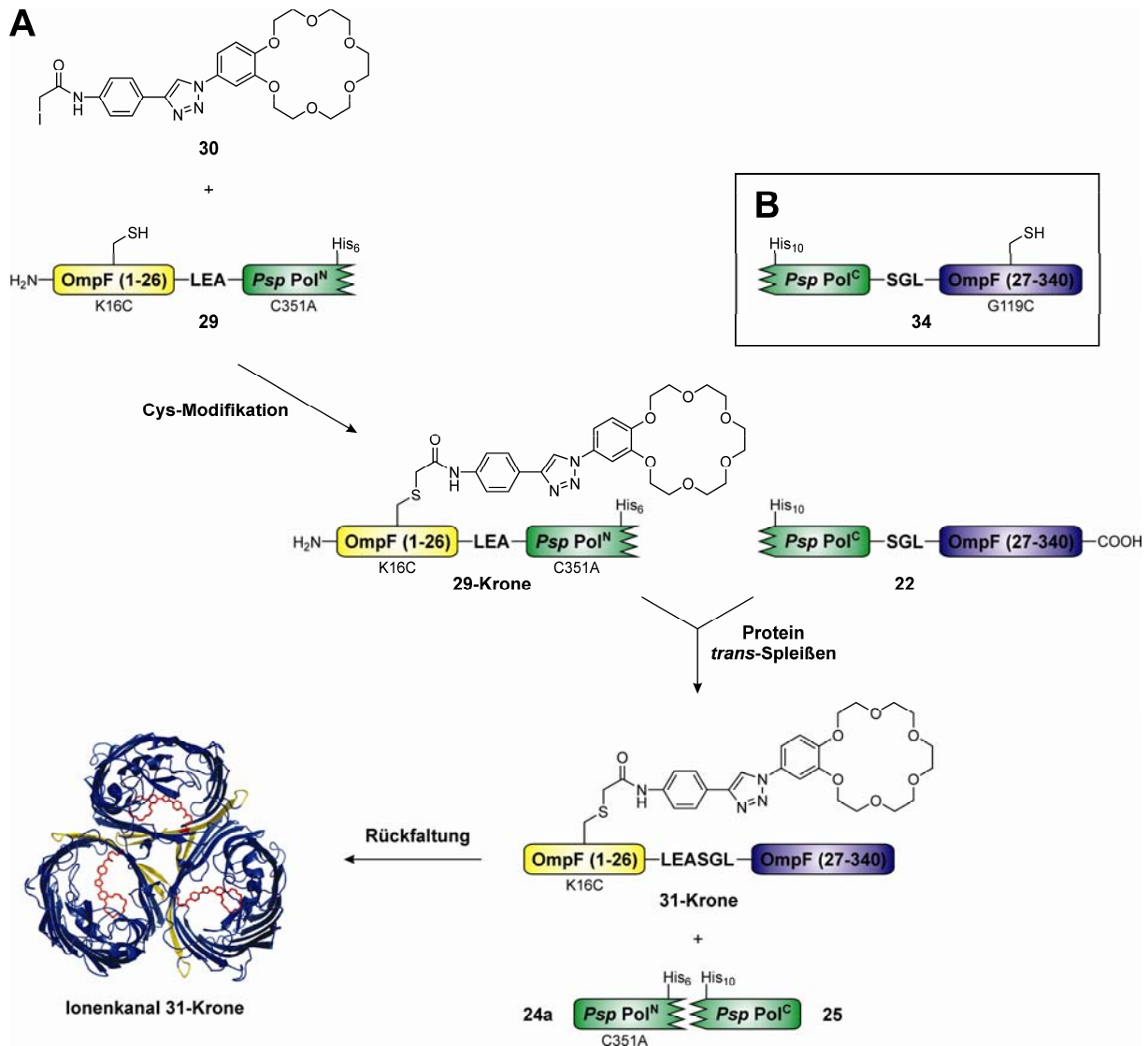


Abbildung 34: Strategie zur Konstruktion eines semisynthetischen OmpF-Ionenkanals. (A) Die Reaktionsfolge setzte sich aus einer Cystein-Modifikation, der Protein *trans*-Spleißreaktion unter denaturierenden Bedingungen und der Rückfaltung des trimeren Kanals zusammen. Als Modulator diente das Benzo-18-Krone-6-Derivat **30**, das mit dem Cysteinrest der Mutante **29** reagierte, bevor durch Protein-Spleißen (**29-Krone** + **22** → **31-Krone** + **24a** + **25**) die OmpF-Fragmente ligiert wurden. Das rückgefaltete Spleißprodukt **31-Krone** konstituierte schließlich den semisynthetischen Ionenkanal. Die gezeigte Struktur geht auf ein Modell zurück. (B) Darstellung des C-terminalen Konstrukts **34** mit einem weiteren Cystein an Position 119, das prinzipiell unabhängig von Cys16 behandelt werden kann, zur Verdeutlichung des konzeptionellen Potentials der Methode.

fusionierten Inteinhälfte das Konstrukt **29** (OmpF(1-26) K16C-LEA-*Psp Pol*^N C351A-His₆) abgeleitet. Zur Modulation der Ionenkanaleigenschaften von OmpF wurde der Baustein **30** synthetisiert, der eine Benzo-18-Krone-6-Einheit enthielt, die optimale Bindungseigenschaften für K⁺-Ionen besaß (siehe Anhang A3). Mit einem ähnlichen Baustein konnte bereits die Selektivität des peptidischen Ionenkanals Gramicidin A für K⁺-Ionen im Vergleich zu Cs⁺ signifikant erhöht werden (Kapitel 1.5). Durch die Cystein-reaktive Iodacetamidgruppe konnte der Kronenether **30** mit Konstrukt **29** konjugiert werden, wodurch das Produkt **29-Krone** erhalten wurde. In der anschließenden Protein-Spleißreaktion mit Konstrukt **22** wurde das OmpF-Derivat **31-Krone** gebildet, das die nicht-native Sequenz LEASGL sowie

die Modifikation an Cys16 enthielt. Durch Rückfaltung des Spleißprodukts **31-Krone** wurden schließlich trimere OmpF-Poren erhalten, die den Kronenether im Lumen jedes konstituierenden Monomers präsentierten. Elektrophysiologische Messungen belegten abschließend die Auswirkungen der Modifikation auf die Kanaleigenschaften.

In Abbildung 34B ist der beträchtliche konzeptionelle Vorteil dieser Synthesestrategie gegenüber herkömmlichen Cystein-Modifikationen angedeutet. Während das Zielprotein **31-Krone** auch durch Modifikation einer OmpF K16C-Mutante ohne Protein *trans*-Spleißreaktion zugänglich ist, erlaubt der skizzierte Weg das Vorhandensein eines weiteren Cysteins im C-terminalen OmpF-Fragment. Demnach kann das Cystein von Konstrukt **34** (His₁₀-Psp Pol^C-SGL-OmpF(27-340) G119C), das durch Einführung einer G119C Mutation im C-terminalen OmpF-Fragment erhalten wurde, unabhängig vom Cysteinrest (Cys16) im komplementären OmpF-Fragment auf chemo- und regioselektive Weise modifiziert werden. Mit dieser Methode wäre zudem eine gerichtete Aufhängung eines Modulators an zwei Punkten innerhalb der Pore zugänglich (Kapitel 5.4.3), die jedoch aus zeitlichen Gründen nicht realisiert werden konnte.

4.3.2 Präparation des modifizierten OmpF-Porins

Zur Etablierung der Konjugationsreaktion eines eingeführten Cysteins in der OmpF-Sequenz und zur Beobachtung der Auswirkungen der Modifikation auf die nachfolgenden Präparationsschritte wurde zunächst mit dem kommerziell erhältlichen Reagenz Fluorescein-5-iodacetamid (5-IAF) gearbeitet. Das Verhalten der modifizierten Proteine konnte damit leicht anhand der fluoreszierenden Proteinbanden in SDS-PAGE-Gelen bei Bestrahlung mit UV-Licht verfolgt werden. Mit diesem Reagenz wurden gemäß Kapitel 3.4.2 die rekombinant hergestellten OmpF-Mutanten **32** und **33** mit einer K16C bzw. G119C Mutation im denaturierten Zustand umgesetzt. Die Modifikationsreaktion zu den Produkten **32-FI** und **33-FI** ist in Abbildung 35A dargestellt. Als Kontrolle diente dabei natives OmpF **26** ohne Cystein.

Bei Bestrahlung mit UV-Licht ist deutlich zu erkennen, dass lediglich die beiden Cystein-Mutanten sowie im Hintergrund einige der noch enthaltenen Verunreinigungen mit dem Fluorophor modifiziert wurden (Spuren b und e). Die native OmpF-Kontrolle ging hingegen keine unspezifischen Nebenreaktionen durch enthaltene Histidin-, Methionin- oder Lysin-Seitenketten ein, so dass die Proteinbanden unter UV-Bestrahlung nicht sichtbar waren, während sie von Coomassie-Blau eindeutig angefärbt wurde (Spuren a und c). Demnach läuft die Konjugationsreaktion höchst chemoselektiv ausschließlich an den eingeführten Cysteinen

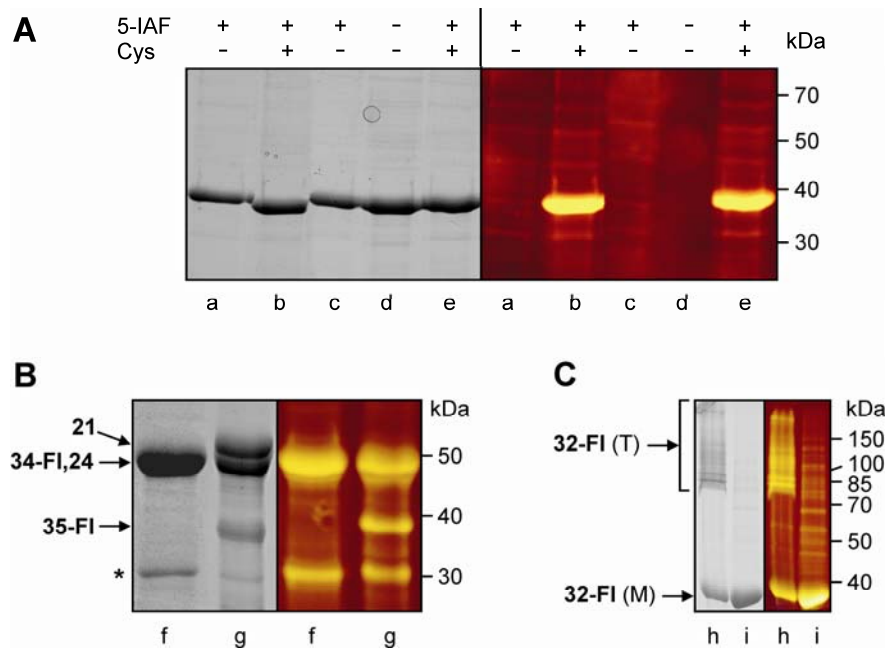


Abbildung 35: Etablierung der Cystein-Modifikation von OmpF-Mutanten mit Fluoresceiniodacetamid. (A) SDS-PAGE Gel der Konjugationsansätze (a: natives OmpF **26**, b: OmpF K16C **32-FI**, c: natives OmpF **26**, d: OmpF G119C **33**, e: OmpF G119C **33-FI**). (B) Protein-Spleißen mit modifiziertem OmpF-Fragment (f: C-terminales Konstrukt **34-FI**, g: Protein-Spleißreaktion **21** + **34-FI** → **35-FI** + **24** + **25**, *Verunreinigung). (C) Rückfaltung nach Modifikation (h: Rückfaltungsmischung von OmpF K16C **32-FI**, i: Probe aus h nach Hitzedenaturierung). Gegenübergestellt sind jeweils SDS-Gele nach Coomassie-Färbung (links) und unter Bestrahlung mit UV-Licht (rechts).

der OmpF-Mutanten **32** und **33** ab. Der durch die Modifikation hervorgerufene Größenunterschied von 403 Da konnte auf den gezeigten Gelen jedoch nicht aufgelöst werden, weshalb sich keine Informationen über die Ausbeute der Reaktion ableiten ließen. Eine mögliche Quantifizierung von unreaktierten freien Cysteinresten mit Ellman's Reagenz (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) lieferte keine auswertbaren Ergebnisse, da die Detektion der potentiell in geringer Konzentration vorliegenden Sulfhydrylgruppen wahrscheinlich aufgrund unvollständiger dialytischer Abtrennung des Reduktionsmittels TCEP durch Störeffekte überlagert wurde. Weiterführende Versuche zur Abtrennung unreaktierter Proteine durch koordinative Bindung der freien Thiolfunktionen an Hg^{2+} -Ionen, die auf einem Chromatographie-Material immobilisiert waren [199], erwiesen sich als ungeeignet. Da Modifikationsreaktionen von Cystein-Seitenketten mit Iodacetamid-Reagenzien erfahrungsgemäß jedoch nahezu quantitativ ablaufen und eine Abtrennung von eventuell noch unmodifiziertem Ausgangskonstrukt nicht realisierbar war, wurden im Folgenden nach der Reaktion alle niedermolekularen Reagenzien durch Dialyse abgetrennt und mit den Konjugaten ohne weitere Reinigung weitergearbeitet.

Um den Einfluss einer Modifikation auf das Spleißverhalten der C-terminalen Hälfte des *Psp*-GBD Pol Inteins zu untersuchen, deren native Sequenz kein Cystein enthält, wurde ausgehend von Konstrukt **22** durch Einführen einer G119C Mutation im C-terminalen OmpF-

Fragment des Konstrukts **34** (His_{10} -*Psp* Pol^C-SGL-OmpF(27-340) G119C) hergestellt. Nach Modifikation mit Fluoresceiniodacetamid wurde **34-FI** zur Protein *trans*-Spleißreaktion mit dem komplementären Protein **21** (OmpF(1-26)-LEA-*Psp* Pol^N-His₆) eingesetzt und lieferte das fluoreszierende Spleißprodukt **35-FI** (OmpF(1-26)-LEASGL-OmpF(27-340) G119C-FI) mit einer Ausbeute von etwa 30 % (Abbildung 35B). Dies lag im Rahmen der zuvor beobachteten Umsätze der Reaktion der unmodifizierten Konstrukte **21** und **22** (vgl. Abbildung 30), so dass die vorgeschaltete Konjugationsreaktion sich kaum nachteilig auf die Spleißaktivität des modifizierten C-terminalen Konstrukts **34-FI** (His_{10} -*Psp* Pol^C-SGL-OmpF(27-340) G119C-FI) auswirkte. Unter Rückfaltungbedingungen verhielt sich mit Fluorescein markiertes OmpF K16C (**32-FI**) ähnlich wie die OmpF-Kontrolle mit nativer Sequenz (**26**) und bildete mit einer Effizienz von etwa 50 % fluoreszierende Trimere (Abbildung 35C). Die Modifikation der Cysteinreste konnte für alle Proben durch massenspektrometrische Analyse der mit Trypsin verdauten Gelbanden nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die Vereinbarkeit von Cystein-Konjugation und Protein *trans*-Spleißreaktion sowie Rückfaltung ohne signifikante Reduktion der Ausbeuten konnte damit auf anschauliche Weise belegt werden.

Nachdem die prinzipielle Durchführbarkeit der einzelnen Schritte der entworfenen Syntheseroute gezeigt worden war, wurde mit der Konstruktion des OmpF-Ionenkanals begonnen, der die Benzo-18-Krone-6-Einheit im Poreninnern enthielt. Die Modifikation von Cys16 in Konstrukt **29** (OmpF(1-26) K16C-LEA-*Psp* Pol^N C351A-His₆) mit dem Kronenetheriodacetamid-Baustein **30** konnte jedoch nicht durch Fluoreszenz verfolgt werden. Indessen konnte der Unterschied der Proteinmassen von 510 Da zwischen dem unmodifizierten Ausgangskonstrukt **29** und dem Produkt **29-Krone** auf SDS-PAGE-Gelen aufgelöst werden, sofern durch eine hohe Verdünnung einer Mischung aus beiden Proteinen sehr schmale Proteinbanden erhalten wurden. Die elektrophoretische Analyse des verdünnten Modifikationsansatzes allein ergab dagegen keine Bande auf der Höhe des unreagierten Ausgangskonstrukts **29** (nicht gezeigt). Dies sprach zunächst für einen nahezu vollständigen Reaktionsumsatz. Allerdings könnte durch den Verdünnungsschritt der geringe Anteil unreaktierten Materials in seiner Konzentration soweit herabgesetzt worden sein, dass er durch Coomassie-Färbung nicht mehr detektierbar war. Um dies herauszufinden, wurde nach abgelaufener Modifikation von **29** mit **30** und Abtrennung aller Reagenzien durch Dialyse zur Probe eine weitere Modifikationsreaktion diesmal mit Fluorescein-5-iodacetamid (5-IAF) durchgeführt, um noch unreaktierte freie Thiolfunktionalitäten zu detektieren. Eine fluoreszierende Bande im dazugehörigen SDS-PAGE-Gel belegte, dass die Reaktion keinen

vollständigen Umsatz ergeben hatte (nicht gezeigt). Quantitative Schlüsse konnten daraus jedoch nicht gezogen werden. Wie weiter unten begründet, wurde für die Bildung von **29-Krone** dennoch von einem Reaktionsumsatz von über 90 % ausgegangen.

Bei der Etablierung der Protein *trans*-Spleißreaktion des mutierten Konstrukts **29** war in Vorversuchen bereits deutlich geworden, dass die Spleißaktivität der N-terminalen Inteinhälfte durch die C351A Mutation und wahrscheinlich zusätzlich durch die K16C Mutation innerhalb des OmpF-Fragments merklich herabgesetzt wurde. Die Reaktion von **29** mit dem komplementären Konstrukt **22** führte nur noch zu etwa 10-20 % zum Spleißprodukt **31** (OmpF(1-26) K16C-LEASGL-OmpF(27-340), nicht gezeigt). Im Vergleich dazu hatte die Reaktion der entsprechenden Konstrukte **21** (OmpF(1-26)-LEA-*Psp* Pol^N-His₆) und **22** (His₁₀-*Psp* Pol^C-SGL-OmpF(27-340)) ohne Mutationen Ausbeuten im Bereich von 30-40 % ergeben (Abbildung 30) ebenso wie die Reaktion von **21** mit dem von **22** abgeleiteten, an Cys119 mit Fluorescein markierten C-terminalen Intein konstrukt **34-FI** (Abbildung 35B). Ein ähnlicher negativer Effekt auf die Aktivität der N-terminalen Inteinhälfte zeigte sich auch bei den Intein konstrukten, die OmpF ohne LEASGL-Insertion als Spleißprodukt hervorbrachten. So lieferte die Reaktion der von **19** abgeleiteten K16C/C351A-Mutante mit dem Reaktionspartner **20** eine so geringe Ausbeute, dass eine Aufarbeitung des Spleißprodukts mit K16C in der ansonsten nativen OmpF-Sequenz unmöglich wurde (nicht gezeigt). Aus Gründen der höheren Spleißausbeute wurde deshalb zur Konstruktion der modifizierten OmpF-Pore die Protein *trans*-Spleißreaktion von **29-Krone** mit **22** eingesetzt, die das OmpF-Spleißprodukt **31-Krone** lieferte, das allerdings neben dem konjugierten Kronenether an Cys16 auch die Erweiterung der OmpF-Sequenz um die Reste LEASGL enthielt (Abbildung 36A).

Wie in Abbildung 36B zu sehen ist, konnte das Zielprotein **31-Krone** durch Protein-Spleißen in ausreichenden Mengen erhalten werden (Spur c), um es nach chromatographischer Reinigung und einem Konzentrationsschritt in die trimere Form zurückzufalten (Spuren d und e) und die modifizierte Pore nach Gelextraktion in gereinigter Form zu erhalten (Spuren f und g). Die Spleißausbeute lag bei etwa 20 % während die Rückfaltung trotz der Größe der konjugierten Kronenethereinheit zu etwa 50 % erfolgte. Die Gesamtausbeute der Präparation lag in einem ähnlichen Bereich wie zuvor für die unmodifizierten Kanäle angegeben wurde (Kapitel 4.2.3). Dabei fiel erneut auf, dass noch erhebliche Mengen des Ausgangskonstrukts **22** enthalten waren, die durch Gelextraktion zwar signifikant reduziert aber nicht vollständig abgetrennt werden konnten. Ein Vergleich der Größen des Spleißprodukts **31-Krone** mit der verkürzten OmpF-Variante **27** (OmpF(27-340) N27C) schloss die Möglichkeit der C-terminalen Spaltung als Nebenreaktion aus (Spuren h, i und j). In allen

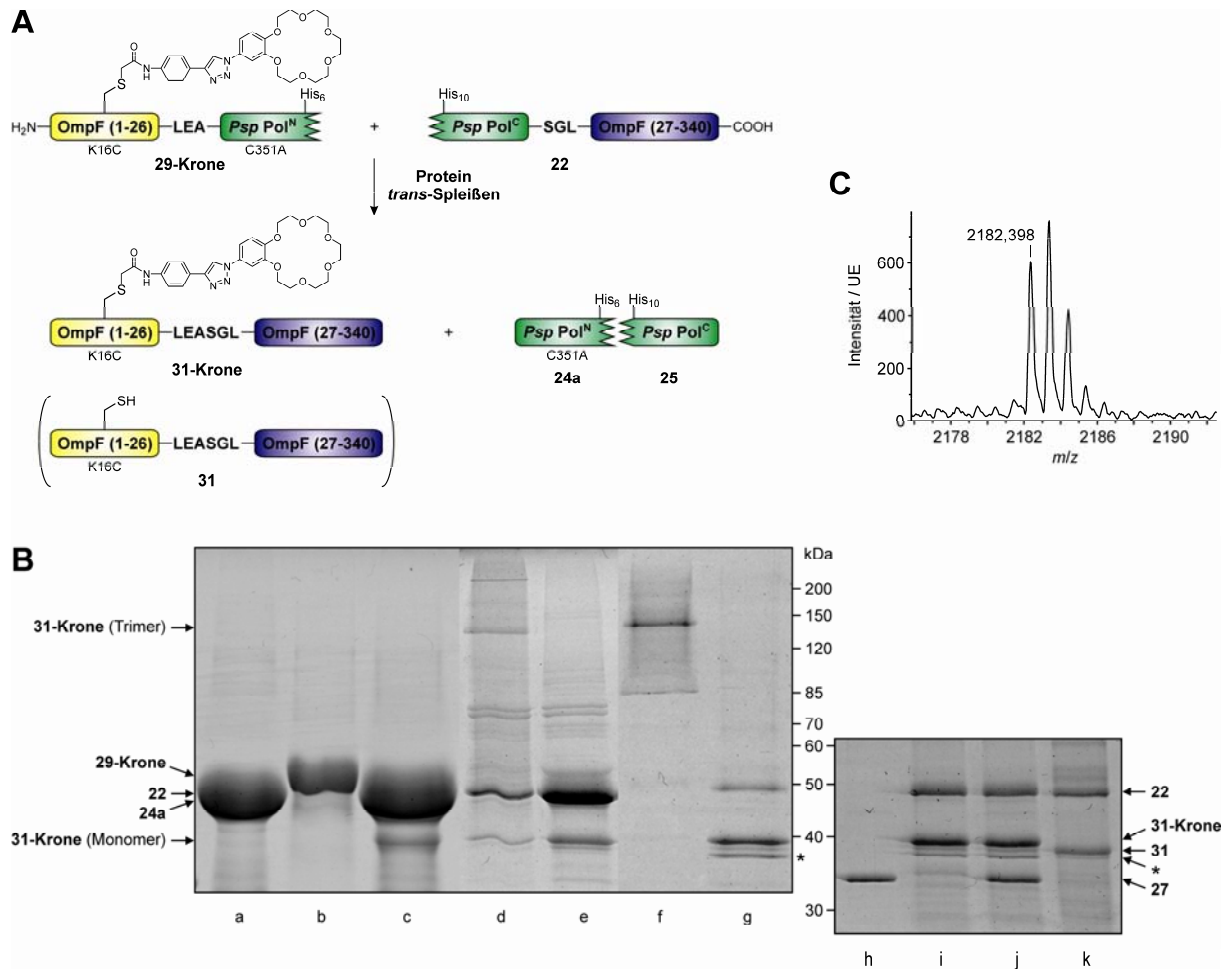


Abbildung 36: Präparation eines konstruierten Ionenkanals. (A) Schema der Protein-Spleißreaktion, die den Kanal **31-Krone** als Spleißprodukt hervorbringt (**29-Krone**: 55,2 kDa, **22**: 48,5 kDa, **24a**: 51,5 kDa, **25**: 14,1 kDa, **31-Krone**: 38,1 kDa). Das unmodifizierte Nebenprodukt **31** (36,7 kDa) ist in Klammern dargestellt. (B) SDS-PAGE-Gel der einzelnen Präparationsschritte (a: **22**, b: **29-Krone**, c: Protein-Spleißreaktion von **29-Krone** und **22**, d: Rückfaltungsmischung des gereinigten Spleißprodukts **31-Krone**, e: hitzedenaturierter Rückfaltungsansatz, f: gereinigte Trimere nach Gelextraktion, g: Probe aus f in denaturiertem Zustand, h: ver-kürztes OmpF-Derivat **27** (34,2 kDa), i: denaturierter Rückfaltungsansatz von **31-Krone**, j: Mischung der Proben der Spuren h und i, k: denaturierter Rückfaltungsansatz des unmodifizierten Spleißprodukts **31**, *Verunreinigung). (C) Massenspektrometrischer Nachweis der Modifikation an Cys16. Gezeigt ist ein Ausschnitt einer MALDI-TOF Analyse der mit Trypsin verdauten Gelbande des Trimers von **31-Krone**, der das modifizierte Fragment (VDLYGC^{Krone}AVGLHYFSK, AS 11-25) mit einer berechneten Masse von 2182,031 Da darstellt.

denaturierten Proben (Spuren e, g, i und j) war direkt unterhalb der Bande des Spleißprodukts **31-Krone** eine weitere sehr dünne Bande zu erkennen, die eine elektrophoretische Mobilität wie das unmodifizierte Spleißprodukt **31** besaß (vgl. Spur i und k). Aus einem Intensitätsvergleich der beiden Proteinbanden wurde daher abgeleitet, dass mindestens 90 % der präparierten OmpF-Derivate die Kronenether-Modifikation trugen. Zusätzlich entstand im Laufe der Zeit eine weitere mit einem Stern gekennzeichnete Bande, die in der frisch angesetzten Rückfaltungsmischung noch nicht zu erkennen war (Spur e), während sie nach der darauf folgenden Gelextraktion (Spur g) und einer erneuten Analyse des Rückfaltungsansatzes nach einiger Zeit (Spur i) in vergleichbarem Umfang auftauchte. Dies sprach für eine partielle Degradation des Spleißprodukts oder des restlichen Ausgangsmaterials. Eine weitere Reini-

gung des trimeren Ionenkanals war aufgrund geringer Probenmengen und einer Differenzierung der Proteine ausschließlich im denaturierten Zustand nicht mehr möglich. Schließlich konnte das Vorhandensein der Modifikation innerhalb der trimeren OmpF-Poren von **31-Krone** durch tryptischen Verdau der Gelbanden im Größenbereich der OmpF-Trimere massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 36C). Das die Spleißstelle enthaltende Fragment konnte dabei wahrscheinlich aufgrund geringer Ionisierbarkeit nicht detektiert werden. Insgesamt konnte die entwickelte Synthesestrategie erfolgreich zur Konstruktion eines Ionenkanals mit synthetischer Komponente auf der Basis des Porins OmpF angewandt werden.

4.3.3 Elektrophysiologische Funktionalitätsbestimmung

Nach erfolgreicher Präparation des modifizierten OmpF-Porins **31-Krone** mit trimerer Struktur wurde schließlich der Einfluss des synthetischen Modulators auf das Verhalten des Ionenkanals bestimmt. Dies erfolgte wie zuvor in Kapitel 4.2.4 beschrieben durch Messung der elektrophysiologischen Eigenschaften in einer *Black Lipid Membrane*. Um erwartete Effekte direkt dem Vorliegen der Kronenethereinheit im Diffusionsweg der Pore zuordnen zu können, wurden zunächst die Eigenschaften des unmodifizierten Spleißprodukts **31** bestimmt, das den gleichen Präparationsweg durchlaufen hatte. Abbildung 37 zeigt eine Gegenüberstellung einiger erhaltenen Stromspuren der unmodifizierten Pore **31** (A) und des konstruierten Ionenkanals **31-Krone** (B). Beide Proben zeigten das typische Öffnungsverhalten des Trimers und stufenweise Schließverhalten der einzelnen Monomere mit diskreten Stromniveaus für jeden Öffnungszustand. In Spur A2 konnten drei gut unterscheidbare Monomerschließereignisse beobachtet werden, die zur Abnahme der Stromstärke in Stufen von 67 pA ($O3 \rightarrow O2$), 59 pA ($O2 \rightarrow O1$) und 35 pA ($O1 \rightarrow G$) führten. Das Auftreten dieser sehr unterschiedlichen Stufen innerhalb desselben Trimers deutete auf eine erhöhte Variabilität der Leitwerte einzelner Monomere des OmpF-Derivats **31** hin. Weiterhin konnte nach dem vollständigen Schließen beobachtet werden, wie ein einzelnes Monomer wieder in den offenen Zustand wechselte ($G \rightarrow O1$). Dabei wurde das gleiche und sehr genau von den übrigen unterscheidbare Stromniveau wie vor dem zuletzt stattgefundenen Schließereignis erreicht. Dieses Verhalten wurde auch für die Membran-extrahierte OmpF-Referenz sowie Spleißprodukt **23** beobachtet (Abbildung 33). Daraus könnte abgeleitet werden, dass nach einem Schließereignis am wahrscheinlichsten das zuletzt geschlossene Monomer wieder in die offene Konformation wechselte. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre indes, dass kooperative Wechselwirkungen innerhalb des gesamten Trimers die Leitwerte der einzelnen

Zustände bestimmten, so dass der Schritt G→O1 oder umgekehrt immer dieselbe Stromstärkeänderung hervorrufen würde, unabhängig davon welches Monomer eigentlich die Zustandsänderung vollzog. Erwartungsgemäß lieferte die quantitative Auswertung der Stromstärkedekremente für das unmodifizierte Spleißprodukt **31** mit $51,7 \pm 13,0$ pA einen Wert mit relativ hoher Varianz. Der Mittelwert sowie der elektrische Leitwert je Monomer von 0,37 nS stimmten dennoch sehr gut mit den Werten überein, die zuvor für die OmpF-Poren mit nativer Sequenz ermittelt wurden (Abbildung 37C). Die K16C Mutation sowie die zusätzlichen Reste LEASGL in der Schleife L1 übten demnach einen unbestrittenen Einfluss auf das Verhalten der Kanäle aus und führten zu einer höheren Heterogenität der Poren, die sich im Mittel jedoch nicht von der nativen Referenz unterschieden. Da allerdings selbst für die native Pore der genaue Zusammenhang von Struktur und Funktion nicht bekannt ist, kann über die Ursachen dieses Verhaltens nur spekuliert werden.

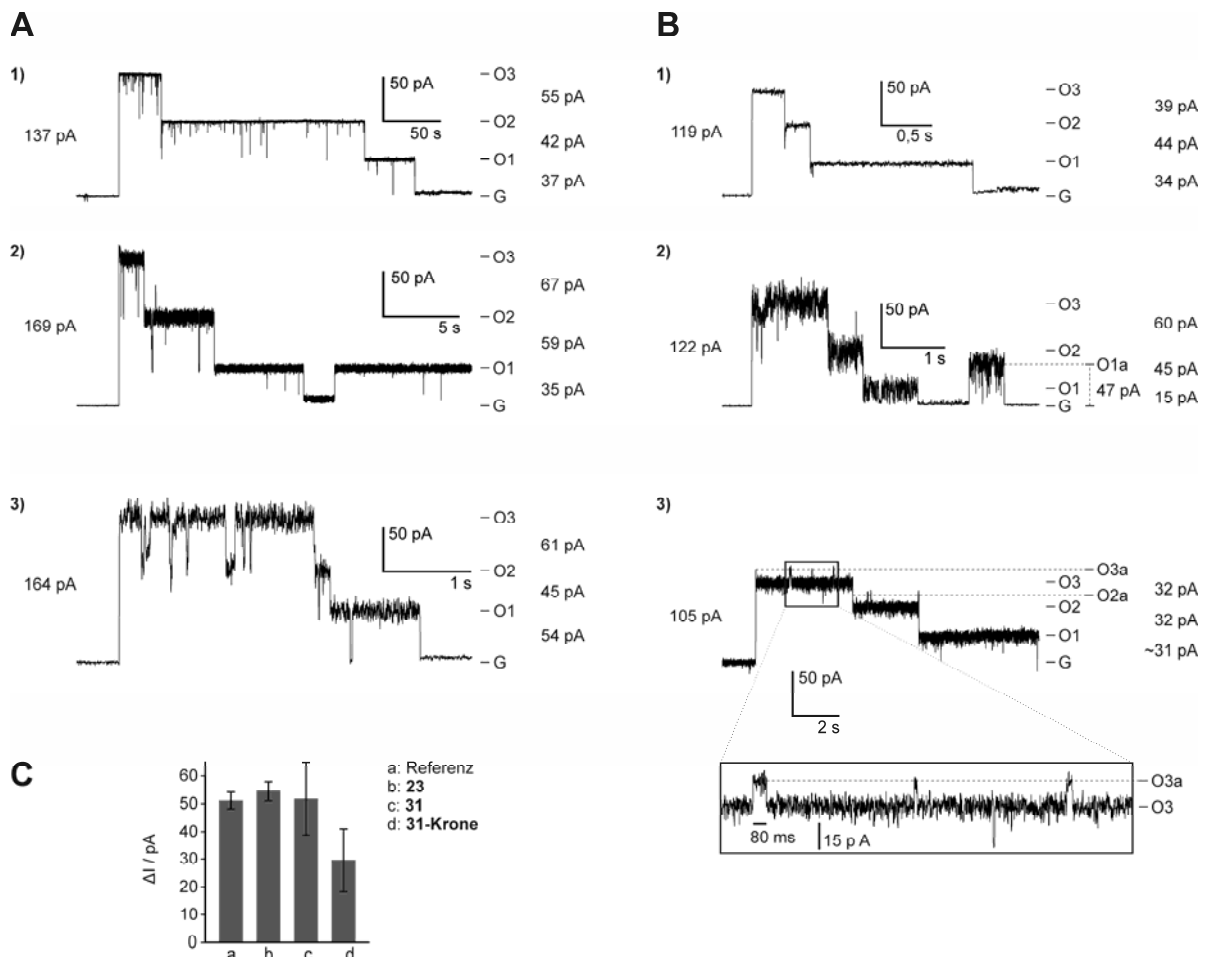


Abbildung 37: Elektrophysiologische Analyse des konstruierten Ionenkanals. (A) Ausgewählte Stromspuren des Spleißprodukts **31** als Referenz ohne Modifikation. (B) Einzelkanalmessungen des Zielproteins **31-Krone**, das eine Benzo-18-Krone-6-Einheit im Kanalinnern präsentiert. Der umrahmte Bereich in Spur 3 ist vergrößert dargestellt. (C) Statistische Auswertung der Änderungen des Stromflusses, die auf Schließereignisse von Monomeren innerhalb separater Trimere zurückzuführen sind (a: Referenz, OmpF aus Membran extrahiert; b: **23**, OmpF-Spleißprodukt mit nativer Sequenz; c: **31**, OmpF(1-26)-LEASGL-OmpF(27-340) K16C Spleißprodukt ohne Modifikation; d: **31-Krone**, OmpF(1-26)-LEASGL-OmpF(27-340) K16C-Krone Spleißprodukt mit Kronenether in der Pore).

Die Wirkung der Anwesenheit der Kronenethereinheit im Lumen der OmpF-Pore **31-Krone** ließ sich aus dem durchschnittlichen Dekrement der Stromstärke von $29,7 \pm 11,3$ pA und dem daraus hervorgehenden elektrischen Leitwert von $0,21$ nS je Monomer ableiten. Die konstruierten Kanäle besaßen demnach einen um 43 % reduzierten Leitwert im Vergleich zur unmodifizierten Pore **31** (Abbildung 37C). Dieser signifikante Unterschied ließ sich wahrscheinlich auf eine weitere Reduktion des Porendurchmessers aufgrund des sterischen Anspruchs der synthetischen Komponente zurückführen. Der hohe Wert der Varianz wurde in diesem Fall unter anderem dadurch hervorgerufen, dass aufgrund der unvollständig abgelaufenen Modifikationsreaktion noch zu etwa 10 % Poren mit unbeeinträchtigtem Diffusionsweg (**31**) enthalten waren.

Hinweise auf das Verhalten des Modulators in der OmpF-Pore lassen sich den Stromspuren B2 und B3 entnehmen. Interessanterweise öffnete sich in Spur B2 nach dem Schließen des trimeren Kanals ein einzelnes Monomer, das abweichend zur oben beschriebenen These nicht im Bereich des Stromniveaus des zuletzt geschlossenen Monomers (O1→G) von 15 pA sondern viel höher bei etwa 47 pA (G→O1a) lag. In diesem Fall könnte das Monomer, das den Übergang O2→O1 von 45 pA verursacht hatte, abweichend vom Regelfall von der Grundlinie aus als erstes Monomer wieder in den offenen Zustand gewechselt sein. Es könnte aber auch als Andeutung zwei verschiedener Konformationen desselben offenen Monomers (O1 und O1a) verstanden werden, die durch unterschiedliche Ausrichtungen der synthetischen Kronenethereinheit in der Pore hervorgerufen wurden. Ein weiterer Hinweis in diese Richtung lässt sich der Stromspur B3 und besonders dem vergrößerten umrahmten Bereich entnehmen. Innerhalb des Stromniveaus des komplett geöffneten Trimers O3 sowie des darunter liegenden Niveaus O2 lassen sich die Unterniveaus O3a bzw. O2a identifizieren. Diese ermöglichen abweichend vom üblicherweise auftretenden kurzzeitigen Rauschen relativ stabile Stromflüsse in einem Zeitfenster bis 80 ms, die in ihrer Stärke um etwa 15 pA über denen der Hauptniveaus O2 und O3 liegen. Interessanterweise liegt zwischen den Niveaus O2 und O3a eine Differenz von etwa 47 pA, die dem Wert des einzelnen Öffnungsereignisse in Spur B2 (G→O1a) entspricht. Zur Erklärung dieser Beobachtung könnte vermutet werden, dass in dem angegebenen Zeitfenster der synthetische Baustein in Richtung des Poreneingangs oder -ausgangs aus dem zentralen Bereich des Lumens herausklappte, der für die Verjüngung der Pore verantwortlich war. Auf diese Weise könnte für kurze Zeit ein Kanal (O3a) mit höherem Leitwert freigesetzt worden sein, der durch die Kronenethereinheit deutlich weniger beeinträchtigt wäre. Der Einbau eines weiteren OmpF-Kanals als Ursache des Leitniveaus O3a ist indes eher unwahrscheinlich, da sich dieser

als komplettes Trimer öffnen und einen deutlich größeren Unterschied sowie erfahrungsgemäß längeren Öffnungszeiten verursachen sollte.

Um schließlich die Funktionalität des Benzo-18-Krone-6-Bausteins als synthetischer Selektivitätsfilter in der OmpF-Pore zu testen, wurden erste BLM-Messungen mit CsCl-haltigem Puffer anstelle von KCl durchgeführt. Da der Kronenether Benzo-18-Krone-6 optimale Bindungseigenschaften für K^+ -Ionen besitzt, könnte der Gewinn der Bindungsenergie beim Durchgang durch die Engstelle der Pore **31-Krone** eine erhöhte Selektivität für K^+ hervorrufen (Kapitel 5.4.3). Dieser Energieterm stand dagegen für Cs^+ -Ionen nicht zur Verfügung, weshalb ein geringerer Leitwert in CsCl-Lösungen erwartet werden könnte. Ein solcher Effekt wurde in anfänglichen Messungen jedoch nicht bestätigt (nicht gezeigt). Ein Grund dafür könnte in der angenommenen Flexibilität der synthetischen Komponente innerhalb der Pore liegen. Dadurch könnte verhindert worden sein, dass die Pore dauerhaft in zusätzlichem Maße verjüngt wurde und sich der kleinere van der Waals-Radius der K^+ -Ionen sowie der Energiegewinn an der Engstelle nicht als unterstützende Effekte auswirken konnten.

Abschließend lässt sich aus dem durchgeführten Projekt das Resümee ziehen, dass es durch Anwendung einer Kombination aus Cystein-Konjugation, Protein *trans*-Spleißen und Rückfaltung möglich war, eine synthetische Komponente in der OmpF-Pore zu installieren und auf diese Weise einen Ionenkanal mit veränderter Aktivität zu erhalten. Der untersuchte Ionenkanal kann zwar durch direkte Modifikation einer Cystein-Mutante von OmpF auch ohne Protein *trans*-Spleißreaktion hergestellt werden, die durchgeführte Methode bietet aber den konzeptionellen Vorteil einer separaten Adressierung der beiden zu ligierenden Proteinfragmente. Das Potential dieses Ansatzes für das *Protein Engineering* von Ionenkanälen zur Schaffung neuer, artifizierlicher Funktionalitäten ist Gegenstand des Diskussionskapitels.

4.3.4 Weiterführende Modifikationen mit Hilfe der 1,3-dipolaren Cycloaddition

Im Hinblick auf eine Erweiterung des vorgestellten semisynthetischen Ansatzes wurden bereits vorbereitende Studien zur Kombination mit der Kupfer-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition (Click-Reaktion, Kapitel 1.4.2) durchgeführt. Durch Cystein-Konjugation war es möglich, sowohl eine terminale Alkineinheit als auch eine Azidfunktion auf die eingeführten Cysteinreste an Position 16 der OmpF-Mutante **33** bzw. auf Cys119 im C-terminalen OmpF-Fragment von **34** (His₁₀-Psp Pol^C-SGL-OmpF(27-340) G119C) zu übertragen (Abbildung 38A). Dabei kamen die Reagenzien *N*-(4-Ethynylphenyl)-2-iodacet-

amid **36** und 4-Azidophenacylbromid **37** zum Einsatz, die zusammen mit weiteren eingesetzten Reagenzien in Abbildung 38B dargestellt sind (siehe Anhang A3). Das erste aus der Reaktion von **33** mit **36** hervorgegangene Konjugat mit einer Alkineinheit **33-≡** wurde anschließend in einer Click-Reaktion mit dem auf Rhodamin basierenden Fluoreszenzfarbstoff **38** umgesetzt, der eine Azidfunktion trug [189]. In Abbildung 38C kann die sehr starke Fluoreszenz der Proteinbande des Produkts **33-Rh** bei Bestrahlung mit UV-Licht als Nachweis einer mit hohen Ausbeuten abgelaufenen Click-Reaktion beobachtet werden. Das zweite Konjugat **34-N₃** aus der Reaktion von **34** mit **37**, wurde dagegen in reziproker Weise genutzt, um die eingeführte Azidfunktion mit der Alkineinheit des Dansylfarbstoffs **39** umzusetzen. Dabei zeigte das Konjugat allein bereits eine sehr geringe Fluoreszenz sowie eine leichte Tendenz zu unspezifischen Wechselwirkungen mit dem schwachen Fluorophor

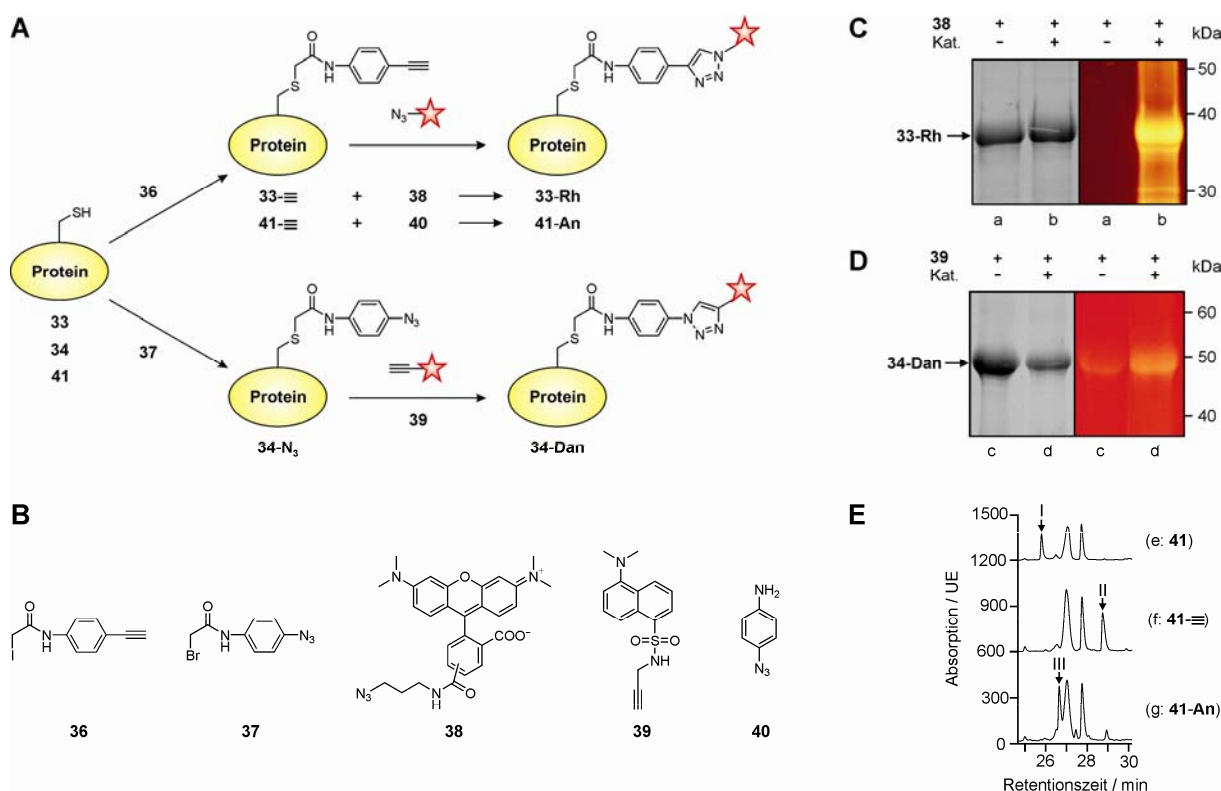


Abbildung 38: Protein-Modifikation durch kombinierte Cystein-Konjugation und 1,3-dipolare Cycloaddition. (A) Schematische Darstellung der Reaktionssequenzen zur Einführung einer Alkineinheit (oben) bzw. einer Azidgruppe (unten) mit anschließender Click-Reaktion. (B) Eingesetzte Reagenzien für die Cystein-Konjugation und Click-Reaktion. (C) SDS-PAGE Gel der Click-Reaktion von **33-≡** mit Rhodaminazid **38** (a: Reaktion ohne Katalysator, b: Reaktionsprodukt **33-Rh**). Das eine Alkingruppe präsentierende Konstrukt **33-≡** wurde zuvor durch Konjugation der OmpF-Mutante **33** mit Reagenz **36** erhalten. Links dargestellt sind die mit Coomassie gefärbten Banden und rechts die Fluoreszenz unter UV-Licht. (D) SDS-PAGE Gel der Reaktion von **34-N₃** mit dem Dansyl-Reagenz **39** (c: unkatalysierte Kontrollreaktion, d: Produkt **34-Dan** der Click-Reaktion). Die vorge-lagerte Funktionalisierung von **34** mit Reagenz **37** ergab das eingesetzte Zwischenprodukt **34-N₃**. (E) HPLC-Chromatogramme der Trypsinverdauung des Cys-Tag-Konstrukts **41** (enthält *Ssp* DnaB^C) sowie der Produkte nach Cystein-Konjugation mit **36** und anschließender Click-Reaktion mit Azidoanilin **40** unter nativen Bedingungen (e: **41**, Fragment I enthält den freien Cys-Tag; f: **41-≡**, Fragment II mit konjugierter Alkineinheit, g: **41-An**, Fragment III enthält die Triazol-Verknüpfung). Die Größen der Fragmente wurden massenspektrometrisch verifiziert (I: ber. 1770,8 Da, gef. 1770,7 Da; II: ber. 1927,9 Da, gef. 1928,0 Da; III: ber. 2062,1 Da, gef. 2061,9 Da). Die übrigen Signale konnten weiteren erwarteten Proteinfragmenten zugeordnet werden.

39 (Abbildung 38D). Nach kovalenter Anknüpfung durch die Click-Reaktion fiel die Fluoreszenzintensität des Reaktionsprodukts **34-Dan** jedoch deutlich stärker aus, was für eine erfolgreiche Umsetzung sprach. Als einschränkender Faktor dieser Reaktion blieb die Empfindlichkeit der Azidfunktion von Reagenz **37** gegenüber Lichteinstrahlung und Reduktionsmitteln wie Thiolen oder TCEP (Herstellerangaben), die jedoch für die vorausgegangene Cystein-Modifikation unerlässlich waren. In das Protein eingeführte Azidgruppen ermöglichen weiterhin die Reaktion mit den zur Staudinger-Ligation einsetzbaren Phosphin-Reagenzien (Kapitel 1.3.2).

Zur Veranschaulichung des Potentials sowohl der Cystein-Konjugation als auch der Click-Reaktion der aufgeführten Reagenzien wurde modellhaft die Umsetzung des Cys-Tag-Konstrukts **41** (Strep-gpD-*Ssp* DnaB^C-Cys-Tag) untersucht. In diesem Konstrukt lag die kurze, ein Cystein enthaltende Cys-Tag-Sequenz fusioniert mit dem C-terminalen Inteinfragment des *Ssp* DnaB Inteins vor, das N-terminal mit dem gpD-Protein des Lambda-Phagen sowie einem Strep-Tag II verbunden war. Die gute Löslichkeit von **41** ermöglichte, dass sowohl die Modifikation des Cys-Tags mit Reagenz **36** als auch die anschließende Click-Reaktion mit Azidoanilin (**40**) unter nativen Bedingungen durchgeführt werden konnte (Abbildung 38A oben). In der anschließenden HPLC-Analyse der Trypsinverdauung des Ausgangskonstrukts **41**, des Zwischenprodukts **41-≡** und des Endprodukts **41-An** wurde eine deutlich bessere Trennung der Proteinfragmente erreicht, als es für OmpF-Konstrukte in Anwesenheit von Harnstoff möglich war (Abbildung 38E). In den erhaltenen Chromatogrammen lässt sich der Verlauf der Cystein-Konjugationsreaktion (**41** + **36** → **41-≡**) anhand der Änderung der Retentionszeiten des Proteinfragments I mit freiem Cys-Tag von **41** (e) gegenüber Fragment II mit konjugierter Alkingruppe von **41-≡** (f) auf anschauliche Weise verfolgen. Aus den Signalintensitäten ließ sich ein nahezu vollständiger Reaktionsumsatz ableiten, während die übrigen Proteinfragmente des Trypsinverdaus davon unbeeinflusst blieben. Die nachfolgende Click-Reaktion mit Azidoanilin (**41-≡** + **40** → **41-An**) brachte das in (g) detektierte Fragment III des Produkts **41-An** mit einer Ausbeute von über 90 % hervor. Eine entsprechende Click-Reaktion mit Rhodaminazid **38** führte sogar zu einer noch weiteren Abnahme des Fragments II (nicht gezeigt).

Mit Übertragung dieser Erkenntnisse auf die Reaktionen der Cystein-Mutanten von OmpF wäre zu erwarten, dass die Konjugationsreaktionen besonders im Anbetracht der freien Zugänglichkeit der Cysteinreste innerhalb der OmpF-Konstrukte im denaturierten Zustand mit ähnlich guten Ausbeuten verlaufen sollten, wie aus Abbildung 38E für die Reaktion von **41** unter nativen Bedingungen abgeleitet wurde. Der Einfluss von Harnstoff in hoher

Konzentration sowie der Anwesenheit von Lipiden und Detergenzien zur Stabilisierung von Membranproteinen auf die Click-Reaktion sind bisher nicht systematisch untersucht worden. Dennoch belegen die durchgeführten Click-Reaktionen von **33-≡** und **34-N₃** eine generelle Anwendbarkeit in Anwesenheit von denaturierenden Harnstoffkonzentrationen. Wie die Kopplung von Cystein-Konjugation und Click-Reaktion zur gerichteten Aufhängung einer synthetischen Einheit an zwei Punkten innerhalb der OmpF-Pore genutzt werden könnte, ist Gegenstand des nächsten Kapitels.

5 Diskussion

Im folgenden Kapitel sollen die dargestellten Ergebnisse genauer betrachtet und in einen größeren theoretischen Kontext eingebunden werden. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf den elektrophysiologischen Eigenschaften von OmpF sowie deren grundlegenden Mechanismen auf molekularer Ebene. Diese sollen anschließend als Grundlage dienen, um neue Funktionalitäten in der Pore zu etablieren und damit neue Eigenschaften zu generieren. Neben dem Vergleich mit Literaturdaten werden dazu ebenfalls weitere Ergebnisse herangezogen, die im Rahmen des Kooperationsprojekts auf der Grundlage des OmpF-Porins erhalten wurden. Abschließend soll das Potential des vorgestellten Konzepts für Anwendungen in weiteren Gebieten beleuchtet werden.

5.1 Kinetische Betrachtung der Protein *trans*-Spleißreaktion

Eine kinetische Beschreibung der Protein-Spleißreaktion *in trans* ist in mehrfacher Hinsicht eine Herausforderung. Denn im Gegensatz zur klassischen Stoßtheorie, auf der die theoretischen Modelle der Reaktionskinetik aufbauen, sind die eigentlichen Reaktanten im Falle gespaltener Inteine keine Kugeln sondern mehr oder weniger unstrukturierte Proteinfragmente. Diese werden nicht durch energiereiche Stöße zur Reaktion gebracht, sondern müssen durch eine bestehende Affinität oder durch unterstützte Dimerisierung assoziieren und zur Ausbildung des spleißaktiven Intein-Komplexes eine Vielzahl von Faltungsschritte durchlaufen, bevor die eigentliche Protein-Spleißreaktion stattfinden kann. Wie sehr der Aufbau der Gesamtstruktur des *Ssp* DnaB Inteins von den einzelnen Inteinhälften bestimmt wird, kann Abbildung 23B entnommen werden. Die Rekonstitution des Inteins ist demnach ein komplexer Vorgang der nicht mit einer Dimerisierung über oberflächliche Kontakte zweier Domänen mit festgelegter dreidimensionaler Struktur vergleichbar ist. Die Komplexität solcher Faltungsvorgänge ist dagegen in der klassischen Theorie der Reaktionskinetik nicht berücksichtigt. Des Weiteren können die Konzepte der Enzymkinetik auf die Protein-Spleißreaktion nicht angewandt werden, da Inteine zwar ähnlich einem Katalysator die Reaktion aktiv vermitteln, aber nicht unverändert aus der Reaktion hervorgehen, so dass ein stetiger Substratumsatz (*turnover*) nicht stattfinden kann. Neben der theoretischen Beschreibung liegen auch in der praktischen Umsetzung einige Fehlerquellen. Die Methode der densitometrischen Auswertung von Proteinbanden in SDS-PAGE Gelen ist mit relativ großen Fehlern behaftet, die an den hohen Standardabweichungen abgelesen werden können. Für eine tiefergehende Analyse wäre neben einer größeren

Datenmenge auch eine systematische Untersuchung des Einflusses der Proteinpräparation auf die Spleißaktivität erstrebenswert. Trotz aller Einwände ist es dennoch gelungen, die experimentell ermittelten Daten mit Hilfe der angewandten Methodik und des stark vereinfachten kinetischen Modells in erstaunlich guter Weise zu beschreiben.

Als Grundlage dieser Diskussion sind in Tabelle 4 erneut die ermittelten Parameter der Protein *trans*-Spleißreaktionen der *Ssp* DnaB und *Sce* VMA Inteine aufgeführt und den aus der Literatur bekannten Geschwindigkeitskonstanten gegenübergestellt. Die Reaktionen des *Ssp* DnaB Inteins lassen sich demnach sehr gut mit dem Modell einer einfach exponentiellen Sättigungsfunktion beschreiben, wie die hohen Werte des Bestimmtheitsmaßes R^2 belegen.

Tabelle 4: Kinetische Daten der Protein *trans*-Spleißreaktion einiger gespaltener Inteine.

Zeile	Reaktion	Intein	Geschwindigkeitskonstante k / s^{-1}	Rapa./ Literatur	P_{aktiv} / %	R^2
1	1 + 2	<i>Ssp</i> DnaB	$7,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-4}$	-	39,7	0,982
2	1 + 2	<i>Ssp</i> DnaB	$1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	+	39,2	0,990
3	6 + 7	<i>Ssp</i> DnaB	$9,9 \pm 0,9 \cdot 10^{-4}$	-	42,9	0,994
4	11 + 12	<i>Sce</i> VMA	$1,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$ (einfach)	+	57,5	0,949
5	11 + 12	<i>Sce</i> VMA	$k_1 = 6,8 \pm 0,7 \cdot 10^{-3}$ (doppelt) $k_2 = 3,5 \pm 0,3 \cdot 10^{-4}$	+	$A_1 = 27,9$ $A_2 = 46,2$	0,999
6	11a + 12	<i>Sce</i> VMA	$1,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$ (C-Spaltung)	+	36,7	0,995
7	F _M	<i>Sce</i> VMA	$2,3 \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ (einfach)	[65,178]	40,2	0,966
8	F _M	<i>Sce</i> VMA	$k_1 = 5,2 \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ (doppelt) $k_2 = 4,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-4}$	-	$A_1 = 27,6$ $A_2 = 19,0$	0,999
9	2×F _M	<i>Sce</i> VMA	$4,9 \pm 0,8 \cdot 10^{-4}$	[65]	29,9	0,988
10		<i>Ssp</i> DnaE	$6,6 \pm 1,3 \cdot 10^{-5}$	[182]		
11		<i>Ssp</i> DnaE	$3,3 \pm 0,4 \cdot 10^{-4}$	[200]		
12		<i>Npu</i> DnaE	$3,5 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$	[38]		
13		<i>Npu</i> DnaE	$1,1 \pm 0,2 \cdot 10^{-2}$	[38]		

In den Zeilen 1-6 sind die ermittelten Daten des *Ssp* DnaB und des *Sce* VMA Inteins aufgelistet, in den Zeilen 7-13 sind Literaturwerte zu finden. Für das *Sce* VMA Intein ist soweit erforderlich zwischen einfacher und doppelt exponentieller Regression unterschieden. Zeile 6 beschreibt die C-terminale Spaltungsreaktion von **11a** (C1A Mutation im Intein) und **12**. P_{aktiv} bezeichnet den Anteil spleißaktiver Ausgangskonstrukte, der mit der maximalen Spleißausbeute gleichzusetzen ist. R^2 steht für das Bestimmtheitsmaß der Regression. In den Zeilen 7 und 8 wurde die Assoziation der Inteinfragmente durch die spontane Dimerisierung von F_M-Domänen (FKBP F36M) eingeleitet. Zeile 9 bezieht sich auf den Einsatz von je zwei F_M-Domänen je Konstrukt. Alle untersuchten Reaktionen wurden bei 25 °C durchgeführt mit Ausnahme der Zeilen 10 (23 °C), 11 (Raumtemperatur) und 13 (37°C).

Außerdem werden weder die Geschwindigkeitskonstante k noch die maximale Spleißausbeute P_{aktiv} durch die Wirkung der FKBP- und FRB-Dimerisierungsdomänen signifikant beeinflusst. Obwohl angenommen werden kann, dass die induzierte Dimerisierung durch Rapamycin vermutlich einen drastischen Effekt auf die Assoziationskinetik der beiden Inteinfragmente ausübte, blieb die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion davon unbeeinflusst. Dies untermauert weiterhin die These einer sehr schnell verlaufenden Assoziation gefolgt von einer langsamen Protein-Spleißreaktion, die nahezu ausschließlich die Kinetik des Gesamtprozesses bestimmt.

Lässt man den Analogieschluss zum bisher am besten charakterisierten *Ssp* DnaE Intein zu, lassen sich noch genauere Einblicke in die Reaktionsabläufe ableiten. Für die Assoziation und Faltung des Inteinkomplexes des natürlich vorkommenden gespaltenen *Ssp* DnaE Inteins, die mit Hilfe einer spleißinaktivierten Form getrennt von der Protein-Spleißreaktion untersucht wurden, konnte aus einer doppelt exponentiellen Auswertung der experimentellen Daten ein biphasisches Verhalten mit einer Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Assoziation von $k_{on} = 2,5 \pm 0,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und für die zweite Phase eine Konstante erster Ordnung von $k = 0,72 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden [46]. Der extrem schnell verlaufenden Assoziation der Inteinfragmente folgte demnach ein langsamerer unimolekularer Prozess, der als ein Faltungsschritt während der Bildung des binären Inteinkomplexes interpretiert wurde. Dabei war die Geschwindigkeitskonstante des langsamen Schritts immer noch um drei bis vier Größenordnungen größer, als die der gesamten Protein *trans*-Spleißreaktion (siehe Tabelle 4, [182]). Zusätzlich konnten für die einzelnen Schritte des Spleißmechanismus (Kapitel 1.1.2) angenäherte Informationen aus kinetischen Untersuchungen der N- und C-terminalen Spaltungsreaktionen erhalten werden. Demnach liefen der N-S-Acyltransfer und die Asparagin-Cyclisierung des *Ssp* DnaE Inteins ebenfalls mit deutlich höheren Geschwindigkeiten als die Gesamtreaktion ab ($1,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bzw. $1,9 \pm 0,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, [182]). Die abschließende spontane S-N-Acylverschiebung zur Ausbildung der Peptidbindung erfolgt vermutlich so schnell, dass die Geschwindigkeit kaum bestimmbar ist. Fasst man die aufgeführten Punkte zusammen, liegt der Schluss nahe, dass die Umesterungsreaktion als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Protein *trans*-Spleißreaktion des *Ssp* DnaE Inteins betrachtet werden kann. In ihrem Verlauf muss das als Thioester aktivierte N-Extein auf die Cystein-Seitenkette der C-terminalen Spleißstelle zur Ausbildung eines verzweigten Intermediats übertragen werden. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass für diese Übertragung eine konformationelle Änderung der Inteinstruktur notwendig ist, um die räumliche Nähe der Spleißstellen zu gewährleisten [201]. Wahrscheinlich sind es genau diese

komplexen Abläufe, die maßgeblich die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Protein *trans*-Spleißreaktion des *Ssp* DnaE Inteins bestimmen. Überträgt man diese Erkenntnisse auf die präsentierten experimentellen Daten des künstlich gespaltene *Ssp* DnaB Inteins, ließe sich ableiten, dass es diese Prozesse um den Faktor 2-15 schneller vermitteln kann als das natürlich gespaltene *Ssp* DnaE Intein, je nachdem welche Studie zum Vergleich herangezogen wird (Tabelle 4, [182,200]). Mögliche konformationeller Änderungen innerhalb der Struktur des *Ssp* DnaB Inteins wurden bereits in Kapitel 1.1.3 beschrieben. Um diese Interpretation weiter zu untermauern, könnten ebenfalls die Spaltungsreaktionen an beiden Spleißstellen des Inteins separat kinetisch charakterisiert werden. Für das *Ssp* DnaE Intein ist anzunehmen, dass es in seiner natürlichen Umgebung offenbar nicht im Hinblick auf Reaktionsgeschwindigkeit evolviert wurde sondern wahrscheinlich eher bezogen auf Affinität oder Spleißausbeute.

Für das *Sce* VMA Intein ergibt sich bezogen auf die oben geführte Diskussion eine etwas andere Situation bei der Identifizierung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts. Für die Kinetik der Protein *trans*-Spleißreaktion sowie der C-terminalen Spaltungsreaktion des gespaltenen Inteins im Kontext der FKBP- und FRB-Dimerisierungsdomänen wurden sehr ähnliche Geschwindigkeitskonstanten ermittelt (Tabelle 4), die zudem in einem sehr ähnlichen Bereich wie die Konstante der N-terminalen Spaltungsreaktion des nativen, *in cis* spleißenden *Sce* VMA Inteins mit $k = 1,9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ lagen [19,202]. Deshalb kann die Zuordnung des langsamsten Reaktionsschritts nicht so eindeutig abgeleitet werden, wie zuvor für das *Ssp* DnaE und analog für das *Ssp* DnaB Intein angenommen wurde. Die Notwendigkeit einer doppelt exponentiellen Auswertung deutet zudem einen Reaktionsablauf in mehreren unterscheidbaren Phasen an. Dieser biphasische Reaktionsverlauf wurde ebenfalls beim Einsatz von F_M -Affinitätsdomänen (FKBP F36M, [64,65]) zur spontanen Dimerisierung der *Sce* VMA Inteinfragmente beobachtet (Tabelle 4, vgl. Zeile 7 und 8). Dagegen verschwand dieses Verhalten aber bei der Verwendung von paarweise angeordneten F_M -Domänen je Konstrukt zur Erhöhung der Affinität genauso wie bei der separaten Betrachtung der C-terminalen Spaltungsreaktion. Im ersten Fall wurde wahrscheinlich die Assoziationskinetik der komplementären Inteinstrukturen durch die konkurrierende unproduktive Dimerbildung gleicher Ausgangskonstrukte soweit gehemmt, dass sie schließlich geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion wurde [64,65]. Im zweiten Fall lief die Asparagin-Cyclisierung entkoppelt von den übrigen durch Mutation unterbundenen Vorgängen ab. Der biphasische Verlauf ist demnach voraussichtlich eine Eigenschaft der Protein-Spleißreaktion des gespaltenen *Sce* VMA Inteins und weist auf eine komplexe Kopplung der mit vergleichbaren Geschwindigkeiten ablaufenden einzelnen Reaktionsschritte des Spleißmecha-

nismus hin. Aus diesem Grund ist keine klare Abgrenzung eines langsamen die Reaktionskinetik bestimmenden Schritts möglich.

Ein weiterer Diskussionspunkt sind die deutlichen Unterschiede in den Spleißausbeuten des *Ssp* DnaB und *Sce* VMA Inteins. Ein deutlich höherer Anteil (P_{aktiv}) der Konstrukte des *Sce* VMA Inteins ist in der Lage, spleißkompetente Intein Komplexe zu bilden (Tabelle 4). Ein Erklärungsversuch einer möglichen Inaktivierung durch Aggregation der Ausgangskonstrukte könnte so ausgelegt werden, dass die Fragmente des *Sce* VMA Inteins womöglich eine höhere Flexibilität und Dynamik im geteilten Zustand besitzen, so dass inaktive Strukturen zu einem höheren Anteil wieder aufgelöst werden und die Fragmente nach forcierter Annäherung die stabile Inteinfaltung ausbilden können. Indes wurde für das *Ssp* DnaB Intein bereits angeführt, dass es wahrscheinlich einen höheren Grad an Präorganisation besitzt, was als Voraussetzung für eine bestehende Affinität angenommen wurde, womit sich die beobachtete Spontaneität der Protein *trans*-Spleißreaktion erklären ließe. Diese Substrukturen könnten die Flexibilität und Dynamik der Inteinfragmente soweit einschränken, dass sie aus einmal gebildeten inaktivierten Aggregaten nicht mehr in eine Form wechseln können, die zur Rekonstitution des Intein Komplexes befähigt ist. Zudem könnten die Inteinhälften ebenso eine Affinität zu gleichen Inteinfragmenten besitzen, was zu unproduktiven Wechselwirkungen führen würde. Demzufolge ginge die Spontaneität der Protein *trans*-Spleißreaktion des *Ssp* DnaB Inteins auf Kosten des Anteils spleißkompetenter Ausgangskonstrukte und als Konsequenz letztlich der Spleißausbeute. Um weitere Aussagen über mögliche Aggregationsprozesse treffen zu können, könnte das Spleißverhalten untersucht werden, wenn eine Inteinhälfte im Überschuss eingesetzt würde. Eine weitere Möglichkeit der Inaktivierung ist die partielle Oxidation essentieller Cysteinreste an den Spleißstellen oder deren Komplexierung durch Metallionen wie Zn^{2+} . Diese Vorgänge sollten zwar durch den Einsatz von Reduktionsmitteln und EDTA im Spleißpuffer unterbunden werden, können aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die herabgesetzte Ausbeute der C-terminalen Spaltungsreaktion des *Sce* VMA Inteins im Vergleich zur Spleißreaktion könnte durch destabilisierende Effekte der C1A Mutation auf die Gesamtstruktur des Inteins hervorgerufen werden, die für den Ablauf der Spaltungsreaktion von essentieller Bedeutung ist.

Zusammenfassend kann trotz der unterschiedlichen charakteristischen Eigenschaften der künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB und *Sce* VMA Inteine festgehalten werden, dass sie die Protein *trans*-Spleißreaktion ähnlich schnell vermitteln können. Der Vergleich mit den *Ssp* DnaE und *Npu* DnaE Inteinen macht zudem deutlich, dass sie damit im Hinblick auf das kinetische Potential zwischen den beiden natürlich in geteilter Form vorkommenden

Vertretern liegen (Tabelle 4). Die *Ssp* DnaB und *Sce* VMA Inteine besitzen zwar nicht die natürliche Robustheit, sind dagegen aber in Kombination mit Biokonjugationsreaktionen für neue semisynthetische Ansätze einsetzbar bzw. in ihrer Aktivität durch Effektdomänen kontrollierbar. Für das Design weiterer geteilter Inteine mit neuen interessanten Eigenschaften sind kinetische Analysen zur Charakterisierung der während der Protein *trans*-Spleißreaktion ablaufenden Schritte von großer Bedeutung.

5.2 Das gespaltene *Psp*-GBD Pol Intein als Werkzeug zur Manipulation unlöslicher Membranproteine

In dieser Arbeit kam das auf artifizielle Weise gespaltene *Psp*-GBD Pol Intein zur Ligation unlöslicher Proteinfragmente eines integralen Membranproteins zum Einsatz. Mit seiner Hilfe konnten rekombinant hergestellte Proteine nach einfacher und schneller Präparation in denaturierter Form im mittleren mikromolaren Konzentrationsbereich und bei physiologischen Temperaturen über Nacht umgesetzt werden. Als Ligationsprodukt wurde unter anderem die native Sequenz des Zielproteins OmpF erhalten, das zur trimeren Pore mit natürlicher Ionenkanalaktivität zurückgefaltet werden konnte. Damit erwies sich das Intein als vielversprechendes Werkzeug für *Protein Engineering* Ansätze mit rückfaltbaren Membranproteinen. Den moderaten Ausbeuten der Protein *trans*-Spleißreaktion, die im Einzelfall in Abhängigkeit von den umzusetzenden Proteinfragmenten zu bestimmen ist, steht die bereits erwähnte leichte Handhabung der äußerst stabilen Ausgangskonstrukte sowie die simple Reaktionsführung als positive Aspekte gegenüber. Vor diesem Hintergrund können mäßige Ausbeute durch größere Ansätze der günstig herzustellenden Reaktanten auf einfache Weise kompensiert werden. Im besonderen Fall der Ionenkanalanalytik kann der geringe Probenbedarf durch diese Methode sehr leicht gedeckt werden. Für viele besonders α -helicale Membranproteine stellt häufig die Rekonstitution der nativen Struktur den limitierenden Schritt während der Präparation dar [203]. Deshalb sind günstige und leicht durchzuführende Probenvorbereitungen erstrebenswert, mit denen die benötigten Proteinmengen zur Rückfaltung erhalten werden können.

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt sind zudem die essentiellen nucleophilen Aminosäuren, denen sich das *Psp*-GBD Pol Intein bedient. An beiden Spleißstellen fungieren Serinreste anstatt des unter Inteinen deutlich weiter verbreiteten Cysteins als Nucleophile. Da das Serin der C-terminalen Spleißstelle Teil des C-Exteins ist und damit auch im Ligationsprodukt verbleibt, erlaubt diese Methode aufgrund des größeren natürlichen Vorkommens von Serin gegenüber Cystein in nativen Proteinsequenzen in weitaus zahlreicheren Fällen eine

spurlose Ligation. Des Weiteren werden damit beide zu ligierenden Proteinfragmente zugänglich für chemo- und regioselektive Biokonjugationsreaktionen an nativen oder durch Mutation eingeführten Cysteinresten (Kapitel 1.2.3). Die Auswirkungen der Cys351Ala Mutation zur Beseitigung des einzigen Intein-eigenen Cysteins, die zu Einschränkungen der Spleißaktivität der N-terminalen Inteinhälfte führte, können unter Umständen durch eine isostere Cys351Ser Mutation ausgeglichen werden.

5.3 Die Elektrophysiologie von OmpF

Zur elektrophysiologischen Analyse der Ionenkanalaktivität von OmpF sind in der Literatur mehrere Ansätze zu finden. Neben Versuchen nach dem *Patch-Clamp* Verfahren wurden hauptsächlich Messungen in planaren Lipiddoppelschichten gemäß der *Black Lipid Membrane* (BLM) Methode durchgeführt. Dabei kamen jeweils verschiedene Mess- und Auswertungsmethoden zum Einsatz, um die Eigenschaften der Kanäle zu quantifizieren. Im Fokus des überwiegenden Teils der Studien sowie der hier vorgestellten Messungen stand die Bestimmung des Leitwerts des OmpF-Kanals, also der Fähigkeit, einen Ionenfluss durch das Porenlumen zu ermöglichen. Dazu wurden im einfachsten Fall ausschließlich Öffnungsereignisse kompletter Trimere oder der Einbau geöffneten trimeren Kanäle betrachtet, was nach dieser Methode nicht unterscheidbar war, und der daraus resultierende sprunghafte Anstieg der Stromstärke ausgewertet (siehe Abbildung 39). Der Vorteil dieses Ansatzes lag darin, dass sich bei Zugabe von größeren Mengen des Porins relativ schnell viele Kanäle nacheinander in die Membran einbauten und in kurzer Zeit ein umfangreiches Datenmaterial erhalten werden konnte. Gleichzeitig stattfindende Schließereignisse wurden dabei allerdings vernachlässigt. Zudem waren große Datenmengen zur Erstellung von

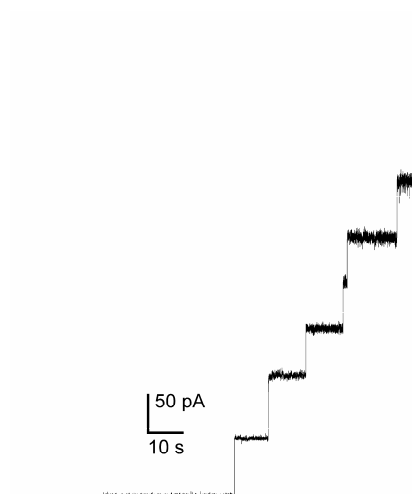


Abbildung 39: Stromspur eines sukzessiven Einbaus geöffneten OmpF-Kanäle in eine *Black Lipid Membrane*. Die Messung wurde bei 100 mV in 300 mM KCl-Lösung durchgeführt.

Histogrammen erforderlich, da die erhaltenen Werte der Stromstärkeinkremente bei diesem Verfahren einer sehr breiten natürlichen Streuung unterlagen. Aus den Maxima der Histogramme ließen sich die Leitwerte der vollständig geöffneten Trimere berechnen.

Eine ausgeprägte Stärke der Ionenkanalanalytik stellt die Möglichkeit zur Einzelkanalmessung bei sehr hoher Verdünnung dar. Auf diese Weise lässt sich nach dem Einbau eines einzelnen Ionenkanals dessen Verhalten im angelegten elektrischen Feld verfolgen, woraus detaillierte Informationen über Abläufe auf molekularer Ebene gewonnen werden können. Mit diesem Ziel wurde eine weitere Herangehensweise etabliert, bei der die Stärke des Stroms durch einzelne komplett geöffnete Kanäle in Abhängigkeit der angelegten Spannung aufgenommen wurde, ohne dass sich weitere Kanäle einbauten oder Schließereignisse zu beobachten waren. Um dies zu erreichen wurden zur Messung geringere Proteinmengen eingesetzt, was als Konsequenz aber deutlich längere Zeitspannen bis zum Einbau eines einzelnen Kanals nach sich zog. Nach Auftragung der Messwerte in einer I - U -Kurve konnte aus der Steigung des linearen, ohmschen Zusammenhangs gemäß Gl. 9 der elektrische Leitwert G der trimeren Kanäle berechnet werden. Dabei tauchte allerdings erneut das Problem einer sehr ausgeprägten Varianz der Messwerte auf. Zur Charakterisierung von Modulatoren innerhalb der Poren konstruierter Ionenkanäle waren dagegen möglichst kleine Standardabweichungen von den Mittelwerten notwendig, um auch weniger ausgeprägte Effekte detektieren zu können. Der gestiegene zeitliche Aufwand verhinderte zudem das Erstellen von Histogrammen auf der Grundlage eines umfangreichen Datenmaterials.

Eine weitere leistungsfähige Methode zur Charakterisierung einzelner Ionenkanäle mit Hilfe einer automatisierten rampenförmigen Erhöhung der Spannung über einen Bereich von etwa -100 bis +100 mV innerhalb weniger Sekunden zur Detektion des ohmschen Verhaltens separater Kanäle erforderte einen erhöhten apparativen Aufwand sowie eine ausgeprägte Einarbeitungszeit, weshalb sie für diese Auswertung nicht zur Verfügung stand [164].

Deshalb wurden in dieser Arbeit zur quantitativen Ionenkanalanalyse, wie in Abschnitt 3.4.9 beschrieben, die stufenartigen Schließereignisse der einzelnen Monomere innerhalb eines separaten Trimers ($O3 \rightarrow O2 \rightarrow O1 \rightarrow G$) ausgewertet. Nach dieser Methode war das Verhalten der von jedem einzelnen Monomer ausgebildeten Poren am unmittelbarsten zugänglich, was differenzierte Auskünfte über molekulare Vorgänge besonders im Hinblick auf die modifizierten Poren versprach. Als Nachteil erwies sich dabei allerdings als Konsequenz der angestrebten Einzelkanalmessung, dass der Konzentrationsbereich sehr genau eingestellt werden musste, in dem das Öffnen eines einzelnen Kanals mit allen drei Monomerschließereignissen zu beobachten war, bevor sich weitere Kanäle einbauten.

Aufgrund des relativ großen Zeitaufwands konnte zur quantitativen Auswertung nur eine limitierte Datenmenge aufgenommen werden. Dennoch wurden nach dieser Methode Resultate mit relativ geringer Varianz erhalten, so dass die Unterschiede zwischen unmodifizierten Poren und konstruierten Kanälen klar belegbar waren. Interessanterweise stimmte der ermittelte Leitwert je Monomer von 366 ± 21 pS für die als Trimer aus der Membran von *E. coli* extrahierte Referenz sehr gut mit einem von Baslé *et al.* sehr ähnlich behandelten Kanal mit 313 pS überein [169]. Dieser wurde aber nach der weiter oben beschriebenen Methode aus einem Histogramm von 286 Insertionen vollständig geöffneten Trimere abgeleitet. Die Konsistenz der Werte wurde ebenfalls durch Daten von *Patch-Clamp* Messungen in 200 mM KCl-Lösung bestätigt, die einen Leitwert von 340 ± 35 pS lieferten, der auf 30-50 Wiederholungen beruhte [204]. Demnach ist die praktizierte Auswertung von etwa 15-30 Monomerschließungen trotz der geringeren Datenmengen dennoch geeignet, aussagekräftige Ergebnisse zu liefern, die die beobachteten Vorgänge realistisch abbilden.

Zur Realisierung der Einzelkanalmessungen mit Beobachtung aller drei Monomerschließereignisse wurden alle Messungen bei einer Spannung von 140 mV durchgeführt, die oberhalb der kritischen Spannung der OmpF-Poren von $V_C \approx 130$ mV lag [160]. Zur Veranschaulichung der kritischen Spannung ist in Abbildung 40A eine *I-U*-Kurve bei einer konstanten Anzahl von OmpF-Kanälen in einer Membran und einer rampenförmigen Änderung der Spannung von 0-200 mV und zurück schematisch dargestellt [192,205]. Bis zu einer Spannung von etwa 130 mV zeigten die vollständig geöffneten OmpF-Kanäle ein Verhalten gemäß dem ohmschen Gesetz. Eine weitere Erhöhung der Spannung führte jedoch nicht mehr zu einem linearen Anstieg des Stromflusses, sondern zog ein spannungsabhängiges Schließverhalten (*voltage gating*) nach sich. Die kritische Spannung V_C ist dabei

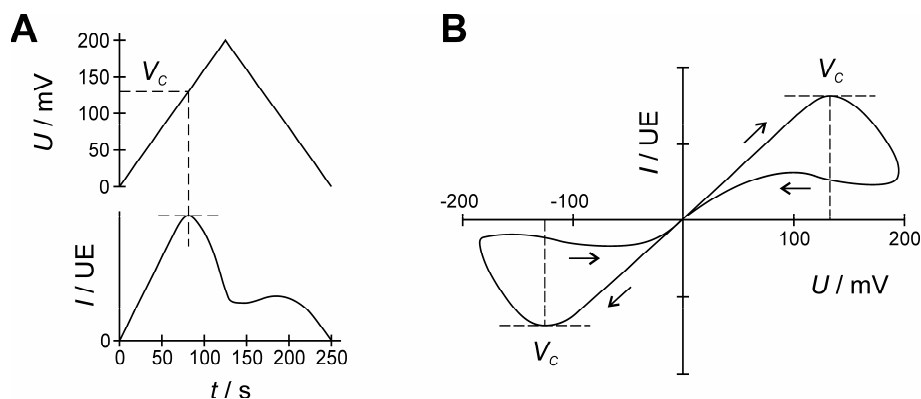


Abbildung 40: Verhalten einer konstanten Anzahl von OmpF-Ionenkanälen in einer *Black Lipid Membrane* bei einem rampenförmigen Spannungsverlauf. (A) Zeitlicher Verlauf der angelegten Spannung (oben) und dazugehöriger Verlauf des Stromflusses durch die Kanäle (unten) mit Markierung der kritischen Spannung $V_C \approx 130$ mV. (B) Hystereseschleife bei rampenförmiger Spannungsführung (0→200→-200→0 mV) mit 1,6 mV/s Änderungsrate. Die Skalierung der Stromstärkeachsen hängt von der Anzahl der eingebauten OmpF-Kanäle ab. Schematisch reproduziert nach [192,205].

als der Wert definiert, bei dem die Steigung der Tangente an die Kurve ihr Vorzeichen wechselt. Oberhalb dieser Schwellenspannung ist die Wahrscheinlichkeit einer Kanalschließung größer als die einer erneuten Öffnung. Das spannungsabhängige Schließen der Poren ist reversibel und tritt ebenso bei umgekehrtem Potential auf, so dass eine Hystereschleife wie in Abbildung 40B erhalten werden können [192,205]. Messspannungen oberhalb von V_C waren für die Einzelkanalmessungen essentiell, um das Schließen der konstituierenden Monomere innerhalb weniger Sekunden zu erreichen. Ansonsten konnten trimere Kanäle bei niedrigeren Spannungen über sehr lange Zeiträume hinweg stabil im komplett geöffneten Zustand verbleiben. Die physiologische Relevanz dieses Verhaltens ist weiterhin fraglich, da natürlich auftretende Donnan-Potentiale (<100 mV) diese Schwellenspannung nicht überschreiten, so dass ein angenommener Schutzmechanismus für den Fall extremer Schwankungen der Osmolarität des umgebenden Milieus nicht aufrecht erhalten werden konnte [152]. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist der Schutz vor einem fehlerhaften Einbau eines OmpF-Kanals in die Cytoplasmamembran, der fatale Auswirkungen für den Organismus nach sich ziehen würde [206].

Neben der Bedeutung dieses Phänomens ist ebenso der zugrunde liegende Mechanismus trotz intensiver Untersuchungen nicht genau bekannt. Es werden umfangreiche konformationelle Änderungen innerhalb der Porenstruktur postuliert, die das Schließen des Kanals herbeiführen [205]. Aufgrund der exponierten Lage der L3 Schleifenregion innerhalb der Pore wurde zunächst angenommen, dass diese sich weiter in Richtung der gegenüber liegenden Porenwand bewegen und die Pore damit vollständig verschließen könnte. Mit Hilfe kovalenter Anknüpfungen an die umgebende Porenwand über Disulfidbrücken durch eingeführte Cysteinreste konnte dieser Mechanismus jedoch weitestgehend ausgeschlossen werden [207,208]. Durch den Einsatz der Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*, AFM) konnten spannungsinduzierte Bewegungen der extrazellulären flexiblen Schleifenregionen (L1, L4-L8) verfolgt werden, die zu einer drastischen Verjüngung des Poreneingangs führten [209,210]. Die sukzessive Deletion jeder einzelnen Schleife konnte das Schließen der Kanäle durchaus beeinflussen aber nicht komplett verhindern, weshalb eine alleinige zentrale Rolle dieses Mechanismus zur Erklärung des spannungsabhängigen Schließverhaltens ebenfalls ausgeschlossen wurde [192]. Die Verringerung positiver Ladung nahe der schmalsten Stelle des Kanals durch Mutationen basischer Reste der Porenwand wie K16A, K16D, R42C und R82C führte zu einer erhöhten Spannungsabhängigkeit, also einer niedrigeren Schwellenspannung V_C [204,211]. Umgekehrt ergab die Beseitigung der negativ geladenen Reste D113 und E117 eine etwas erniedrigte Spannungsabhängigkeit [211].

Weitere Mutationsstudien entsprachen diesem Trend indes nur in Ansätzen und führten ebenso wenig zum Verschwinden des Phänomens. Es ist durchaus möglich, dass es sich dabei um einen ausschließlich *in vitro* auftretenden Prozess handelt, der zwar keine physiologische Bedeutung besitzt, aber im Hinblick auf biosensorische Anwendungen der OmpF-Kanäle von großem Interesse ist (Kapitel 5.6).

5.4 Der konstruierte Ionenkanal OmpF

Mit Hilfe von Cystein-Konjugation, Protein *trans*-Spleißen und Rekonstitution der trimeren OmpF-Struktur durch Rückfaltung konnten modifizierte Ionenkanäle konstruiert werden, die ein Benzo-18-Krone-6-Derivat im Lumen präsentierten. Durch die Anwesenheit des Modulators wurde der mittlere Leitwert der Poren um 43 % im Vergleich zu einem aus der *E. coli* Membran extrahierten Referenzprotein reduziert. Zur Steigerung der Spleißausbeute enthielten die konstruierten Kanäle zusätzlich die Reste LEASGL an der Ligationstelle. Neben den erniedrigten Leitungseigenschaften wurde auch eine breitere Streuung der Messwerte sowie Anzeichen für das Auftreten von Unterniveaus innerhalb einzelner Öffnungszustände beobachtet. Zur Diskussion dieser Ergebnisse auf molekularer Ebene soll zunächst die Bedeutung einzelner Porenbereiche sowie deren Einfluss auf die Kanaleigenschaften anhand von gängigen Hypothesen beleuchtet werden. Im Anschluss sollen weitere Ergebnisse des Kooperationsprojekts mit analogen Ionenkanälen mit in die Beschreibung einbezogen werden, um eine detailliertere Sicht auf die Abläufe innerhalb der konstruierten Kanäle zu erhalten. Abschließend werden weitere Schritte diskutiert, die zur Erzeugung neuer Funktionalitäten führen sollen.

5.4.1 Die molekulare Basis der veränderten Kanaleigenschaften

In zahlreichen Studien wurde bereits versucht, verschiedene Aspekte der Kanalaktivität von OmpF systematisch zu untersuchen, um ein Bild vom molekularen Ursprung der beobachteten Eigenschaften zu erhalten. Dabei ist es bisher jedoch nicht gelungen, die einzelnen Einblicke zu einem konsistenten Gesamtbild zusammenzufügen, das vollständig experimentell belegbar wäre. Insgesamt ist wahrscheinlich von einem komplexen Zusammenwirken verschiedener Strukturelemente auszugehen, so dass selbst kleine Eingriffe in die natürliche Sequenz nicht vernachlässigt werden können. Aus diesem Grund ist eine profunde Diskussion der Abläufe immer mit Einschränkungen verbunden, soll aber dennoch im Folgenden unternommen werden.

Bevor die synthetische Komponente überhaupt eingeführt wurde, wurde eine Veränderung der Kanaleigenschaften von OmpF bereits durch die K16C Mutation sowie die Erweiterung der Schleife L1 um die Reste LEASGL vorgenommen. Die an C16 noch unmodifizierte Pore **31** zeigte eine deutlich ausgeprägtere Streuung der einzelnen Messwerte im Vergleich zu Kanälen mit natürlicher Aminosäuresequenz (siehe Abbildung 37C). Die Verlängerung der Schleife L1 am extrazellulären Ende und die damit verbundene Erhöhung der Flexibilität könnten Auswirkungen auf das von diesem Porenbereich ausgeformte Vestibül haben, in dem die drei Poren zusammenlaufen, und damit zur erhöhten Heterogenität beitragen.

Ein zentrales Element der OmpF-Kanäle ist das ausgeprägte transversal verlaufende elektrostatische Feld an der Engstelle der Pore, das hauptsächlich durch asymmetrische Verteilung saurer und basischer Aminosäuren an der Porenwand (R42, R82, R132, K16) sowie in der gegenüberliegenden L3 Schleife (D113, E117) hervorgerufen wird (Kapitel 1.6). Die resultierende Feldstärke ist ausreichend, um Wassermoleküle in diesem Bereich des Lumens ähnlich wie in einem Kondensator entsprechend ihrer Polarität auszurichten. In gleicher Weise orientieren sich auch gelöste polare Substanzen bei ihrem Durchgang durch den Kanal, so dass eine eindimensionale Diffusion resultiert, die mit deutlich höheren Raten ablaufen kann. Unpolaren Stoffen wird dagegen die Passage durch die polarisierte Engstelle erschwert, so dass Porine trotz des relativ großen Porendurchmessers eine Selektivität für polare Stoffe besitzen [212]. Neben der Ausbildung eines elektrischen Feldes sind die sauren und basischen Reste zusätzlich an Bindungsstellen für verschiedene Substanzen wie β -Lactam-Antibiotika oder Polyamine wie Spermin oder Cadaverin beteiligt [213-215]. Die Leitungseigenschaften von Kationen durch die OmpF-Pore werden ebenfalls von spezifischen Interaktionen mit lateralen Ladungen bestimmt, die in das Lumen hineinragen. Moleküldynamik (MD) Simulationen ergaben, dass monovalente Kationen bei niedriger Elektrolytkonzentration mit ausgeprägter Affinität an die Seitenkette von Asp113 binden, was zu einer Erhöhung der lokalen Kationenkonzentration in der Konstriktionszone führt [216,217]. Auf diese Weise wird eine gesteigerte Translokationsrate im Vergleich zur freien Diffusion durch eine inerte, mit Wasser gefüllte Pore erreicht und die Selektivität für Kationen gegenüber Anionen begründet [218]. Bei Erhöhung der Elektrolytkonzentration wird der Permeabilitätsunterschied zwischen Kationen und Anionen wahrscheinlich aufgrund von Abschirmungseffekten deutlich geringer. Zudem tritt keine Sättigung des Ionenflusses ähnlich einer Michaelis-Menten Kinetik auf, so dass bei hohen Konzentrationen die unterstützenden Effekte der Kationenleitung durch Bindung an Asp113 weitgehend verschwinden.

Vor diesem Hintergrund ist es wahrscheinlich, dass die K16C Mutation in der OmpF-Pore **31** einen nicht zu vernachlässigenden Effekt ausübt. Der basische Lysinrest wurde durch Cystein ersetzt, das bei pH 7,2 der BLM-Messungen trotz eines $pK_a \approx 9$ der freien Aminosäure in vielen Fällen zu einem bedeutenden Anteil im deprotonierten, negativ geladenen Zustand vorliegt, sofern es in ein Protein eingebaut ist [106]. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass alle Konjugationsreaktionen mit Cys16 hohe Ausbeuten bei pH 7,0 innerhalb von zwei Stunden erzielten. Durch diesen Eingriff in die natürliche Ladungsverteilung könnte das stabilisierende Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der OmpF-Pore gestört werden. Wie bereits erwähnt wirken sich die zusätzlichen Reste LEASGL sowie die K16C Mutation zwar auf die Heterogenität der Poren aus, im Mittel nivellieren sich die Effekte aber.

Die Reduktion der mittleren Leitfähigkeit des in dieser Arbeit konstruierten Ionenkanals **31-Krone** wurde auf den sterischen Anspruch der Benzo-18-Krone-6-Einheit an der Engstelle der Pore zurückgeführt, der den Ionenfluss zusätzlich behinderte. Die kovalente Anknüpfung an nur einer Position (Cys16) ließ eine konformationelle Flexibilität des Modulators innerhalb des Porenlumens erwarten. Insofern war es nicht verwunderlich, dass die Ionenkanalmessungen eine relativ große Varianz offenbarten, die sich vermutlich auf unterschiedlich starke Beeinträchtigungen des Ionenflusses durch verschiedene Modulator-Konformationen zurückführen ließen. Im Hinblick auf die im folgenden Kapitel 5.4.2 vorgestellten Ergebnisse einer ähnlich modifizierten OmpF-Pore stellte sich auch für den Kanal **31-Krone** die Frage, ob eventuell diskrete Konformere aufgrund stabilisierender Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der Pore bevorzugt auftreten. Dies sollte sich innerhalb der breiten Verteilung der einzelnen Messwerte in einer Akkumulation in einem abgrenzbaren Bereich manifestieren. Um dieser Frage nachzugehen, sind in Abbildung 41 alle ausgewerteten Messwerte von Monomerschließereignissen einzeln aufgetragen. Darin deutet sich für die Pore **31-Krone** eine separate Population an, die den Ionenfluss auf $13,1 \pm 1,8$ pA limitiert. Für die übrigen Werte ergäbe sich damit ein Mittel von $33,5 \pm 8,8$ pA. Diese Verteilung der Messwerte könnte man sehr spekulativ so interpretieren, dass tatsächlich eine stabilisierte Vorzugskonformation existiert, die ähnlich wie in Kapitel 5.4.2 die Pore nahe der engsten Stelle durchspannt und so zu einer effektiveren Kanalblockierung führt. Für die flexibleren Konformationen könnte angenommen werden, dass diese teilweise in Richtung der Porenöffnungen aus der Engstelle herausklappen und dadurch den Ionenfluss weniger stark beschränken. Daneben bleibt zu berücksichtigen, dass noch Reste unmodifizierter Poren enthalten sind. Zur Untermauerung dieser Hypothese sind indes umfangreichere Messungen

zum Erstellen eines aussagekräftigen Histogramms nötig. Sofern dabei noch mehr Kanäle beobachtet würden, die Stromspuren wie diese in Abbildung 37 B3 erzeugen, in der wahrscheinlich der Wechsel zwischen zwei Konformationen zeitlich aufgelöst verfolgt werden kann, ließen sich daraus sogar kinetische Schlüsse über die Abläufe innerhalb des Kanals ziehen.

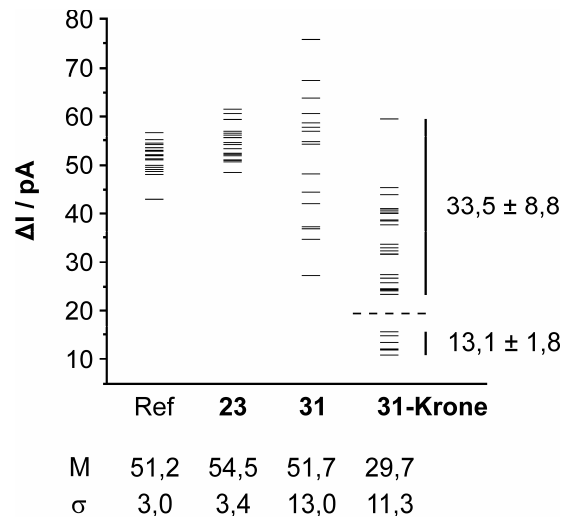


Abbildung 41: Grafische Darstellung der einzelnen Messwerte von Monomerschließungen. Unten sind die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (σ) dargestellt (Ref: Membran-extrahierte Pore, **23**: Spleißprodukt mit nativer Sequenz, **31**: Spleißprodukt mit K16C Mutation und LEASGL Insertion, **31-Krone**: mit Kronenether modifizierte Pore). Die gestrichelte Linie trennt zwei potentielle Populationen mit den rechts angegebenen statistischen Werten.

5.4.2 Vergleich mit analogen OmpF-Poren

Die Interaktion eines Modulators mit den Aminosäure-Seitenketten von OmpF im Lumen der Pore konnte von Simon Reitz röntgenographisch untersucht werden (Abbildung 42, [181,219]). Zu diesem Zweck wurde das Dibenzo-18-Krone-6-Derivat **42** mit dem Cysteinrest einer OmpF K16C-Mutante konjugiert (A). Von diesem konstruierten Ionenkanal konnten Proteinkristalle erhalten werden, die bis zu einer Auflösung von 3,4 Å Röntgenbeugung zeigten. In der daraus ermittelten dreidimensionalen Struktur ragte der Modulator von der Porenwand durch das Lumen hin zur Schleifenregion L3 (B und D). Dabei standen einige Sauerstoffatome des Kronenethers in Wechselwirkung mit den basischen Resten Arg42, Arg82 und Arg132 der Porenwand, während sich die gegenüberliegende Seite in unmittelbarer Nähe von Asp113 und Glu117 der L3-Schleife befand (C). Die distal gelegene Arylgruppe nahm an mehreren van der Waals Wechselwirkungen mit Tyr102, Tyr106, Asp113, Ala123 und Arg132 der Schleife L3 teil. Diese stabilisierte Konformation stellte allerdings lediglich eine Momentaufnahme des Ionenkanals dar. Denn zum einen wurde in einer zweiten Kristallform keine Elektronendichte in der Pore beobachtet, die dem Modulator

zugeordnet werden konnte. Zum anderen zeigten die Ionenkanäle in Einzelkanalmessungen ähnlich wie **31-Krone** eine breite Streuung der Leitwerte, die auf verschieden ausgeprägte Beeinträchtigungen des Leitungswegs durch den Modulator hinwiesen (E).

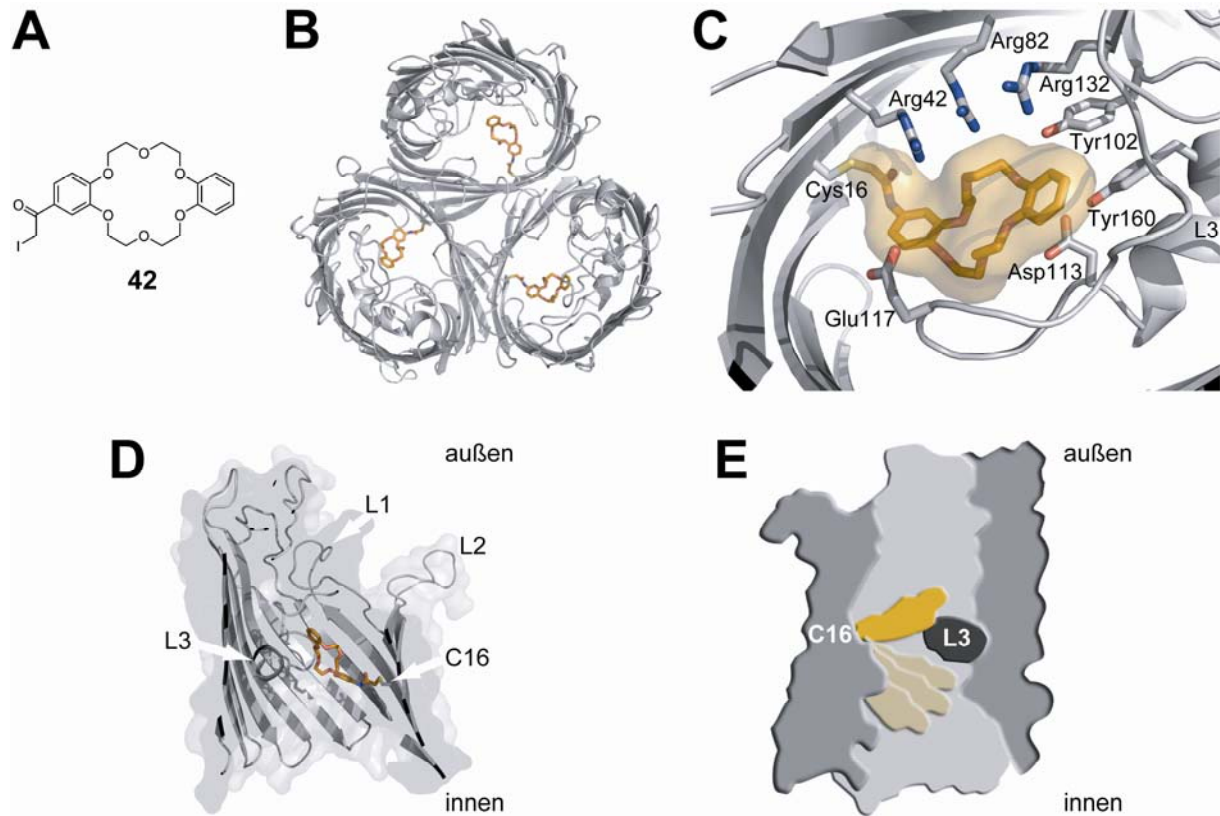


Abbildung 42: Kristallstruktur einer modifizierten OmpF K16C-Mutante. (A) Dibenzo-18-Krone-6-Derivat (**42**) zur Cystein-Modifikation. (B) Aufsicht von der extrazellulären Seite mit dem Protein in grau und dem Modulator in orangefarbener Farbe. (C) Vergrößerung der Engstelle mit Oberflächendarstellung der synthetischen Komponente und den an Wechselwirkungen beteiligten Aminosäure-Seitenketten. (D) Seitenansicht auf den Querschnitt. (E) Darstellung der blockierten Pore (orange) sowie weiterer potentieller Konformationen des Modulators (hellgelb) im Porenlumen, die höhere Leitwerte zuließen (PDB-Datei: 3FYX, [181]).

5.4.3 Möglichkeiten weiterer Transformationen zur Etablierung künstlicher Selektivität

Im Rahmen der Präparation der Pore **31-Krone** war es möglich, einen neuen semisynthetischen Ansatz zur Konstruktion modifizierter OmpF-Kanäle zu etablieren. Dabei wurde ein Benzo-18-Krone-6-Derivat durch kovalente Anknüpfung an einer zentralen Position der Porenwand im Lumen platziert. Als funktionelle Auswirkung ergab sich ein reduzierter Leitwert des konstruierten Kanals, während die Kronenethereinheit ihre Wirkung als potentieller synthetischer Selektivitätsfilter für K^+ -Ionen innerhalb der nur leicht Kationen-selektiven OmpF-Pore wahrscheinlich aufgrund zu hoher Flexibilität nicht entwickeln konnte. Die Methode bietet jedoch durchaus weiteres Potential, um eine neue Funktionalität in der

Pore zu etablieren und damit ihren Wert für *Protein Engineering* Ansätze von Ionenkanälen noch weitergehend unter Beweis zu stellen.

In Kapitel 5.4.1 wurde bereits erläutert, wie die Selektivität der OmpF-Kanäle für Kationen durch die Bindung an Asp113 und die damit verbundene Erhöhung der lokalen Konzentration zustande kommt. Bezogen auf das Energieprofil der Pore (Abbildung 43) bedeutet dies, dass am Maximum der Potentialbarriere (E_{Max}) – für OmpF die Engstelle der Pore – durch die Bindung an Asp113 und den damit verbundenen Gewinn der Bindungsenergie E_{Bind} für Kationen ein lokales Energieminimum existiert. Dies bedingt eine Erniedrigung der Potentialbarriere (E_{Kation}) und somit eine erhöhte Translokationsrate, die letztlich die beobachtete Kationenselektivität hervorruft [218]. Nach diesem Mechanismus ist die Benzo-18-Krone-6-Einheit ein vielversprechender Kandidat, um eine zusätzliche Bindungsstelle in der Konstriktionszone ausschließlich für K^+ -Ionen zu etablieren. Durch Anknüpfung an einer zweiten Position innerhalb der L3 Schleife (siehe unten) könnte es möglich werden, den Kronenether in der Engstelle zu fixieren. Durch Komplexierung der K^+ -Ionen und die freiwerdende Bindungsenergie könnte ein weiterer Energieterm hinzugewonnen werden, der die Überwindung der weiter reduzierten Potentialbarriere (E_{Kalium}) spezifisch für diese Spezies begünstigen würde. Mit Hilfe des Kronenetherderivats könnte auf diese Weise eine neue Selektivität der konstruierten OmpF-Pore für K^+ -Ionen gegenüber den übrigen monovalenten Alkalimetallionen etabliert werden. Eine Platzierung des synthetischen Selektivitätsfilters in unmittelbarer Nähe von Asp113 könnte zudem Synergieeffekte der beiden Bindungsstellen

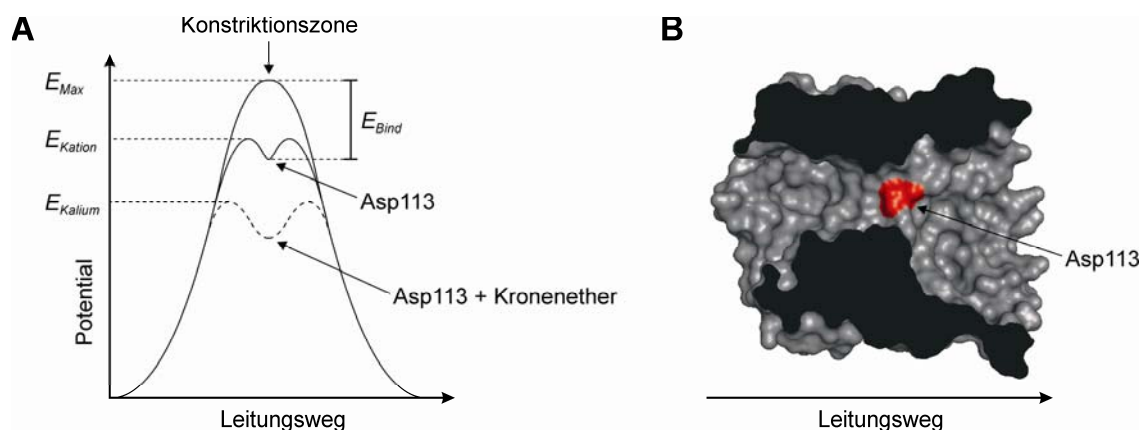


Abbildung 43: Schematische Darstellung des Potentialverlaufs entlang des Leitungswegs durch die OmpF-Pore. (A) Das Maximum der Potentialbarriere E_{Max} liegt etwa auf halbem Weg in der Konstriktionszone des Porenlumens. In diesem Bereich bildet Asp113 eine Bindungsstelle für Kationen. Beim Durchgang gewinnen diese den Term der Bindungsenergie E_{Bind} hinzu, wodurch sich die Potentialbarriere für diese Spezies auf den Wert E_{Kation} reduziert. Die Etablierung einer zweiten Bindungsstelle und zwar ausschließlich für K^+ -Ionen durch Platzierung eines Kronenethers in diesem Porenbereich könnte zu einer weiteren Reduktion der Barriere (E_{Kalium}) führen (gestrichelter Verlauf). Auf diese Weise könnte eine erhöhte Translokationsrate von K^+ im Vergleich zu anderen Kationen erreicht werden. (B) Querschnitt einer Monomerstruktur der OmpF-Pore mit Aufsicht auf die L3 Schleife. Die Bindungsstelle von Asp113 ist rot eingefärbt. Auf der linken Seite befindet sich das extrazelläre Ende.

hervorrufen. In einem konträren Ansatz könnte eine Asp113Cys Mutation als zweiter Anknüpfungspunkt genutzt werden, um die Bindung der übrigen Alkalimetallionen an dieser Stelle zu verhindern und dadurch die relative Permeabilität der K^+ -Ionen zu erhöhen. Ergänzend könnte der sterische Bedarf des Modulators durch geschickte Ausrichtung in der Pore genutzt werden, um eine potentielle Kanalblockierung für alle übrigen Substanzen außer K^+ -Ionen zu erreichen. Für OmpF konnte bereits eine erhöhte Kationenselektivität durch Volumenreduktion mit Hilfe von Cystein-Modifikation erreicht werden [165]. Dafür könnte die Fixierung an einer dritten Position nötig werden, die synthetisch allerdings schwierig zugänglich ist.

Im Gegensatz zu Gramicidin A, dessen Kationenselektivität ebenfalls mit einem Kronenetherderivat verändert wurde (Kapitel 1.5), ist die Dehydratation der K^+ -Ionen beim Durchgang durch den OmpF-Kanal keine notwendige Voraussetzung, da dieser einen maßgeblich größeren Durchmesser besitzt und vollständig mit Wasser gefüllt ist. In beiden Fällen begründet aber der Gewinn der Bindungsenergie an einer Potentialbarriere – für Gramicidin A die partielle Dehydratation beim Eintritt in den Kanal, für OmpF die Passage der Engstelle – die Selektivitätseigenschaften. Ebenso scheint für beide Kanäle eine kovalente Verknüpfung an zwei Punkten erforderlich zu sein.

Zur Realisierung einer gerichteten Zweipunktaufhängung des Kronenethers in der Pore ist die hier etablierte Methode aus Cystein-Modifikation und Protein *trans*-Spleißen prinzipiell sehr gut geeignet. Wie in Abbildung 34 bereits dargestellt, ist es möglich, neben der Modifikation von Cys16 im N-terminalen OmpF-Fragment außerdem an geeigneter Stelle im C-terminalen Fragment ein weiteres Cystein z. B. durch eine Gly119Cys-Mutation in der L3 Schleife direkt gegenüber von Cys16 einzuführen. Durch Modifikation mit **43** könnte ein Kronenetherderivat eingeführt werden, das zusätzlich eine Azidgruppe trägt (Abbildung 44). Mit Reagenz **36** könnte wie bereits beschrieben (Kapitel 4.3.4) im komplementären Fragment eine Alkinfunktion platziert werden. Nach erfolgreicher Ligation und Rückfaltung könnte so ein doppelt modifizierter OmpF-Kanal rekonstituiert werden. Auf diese Weise wäre eine chemo- und regioselektive Modifikation der beiden Cysteinreste mit unterschiedlichen Reagenzien zugänglich. Zur Fixierung der Kronenethereinheit wäre schließlich noch eine

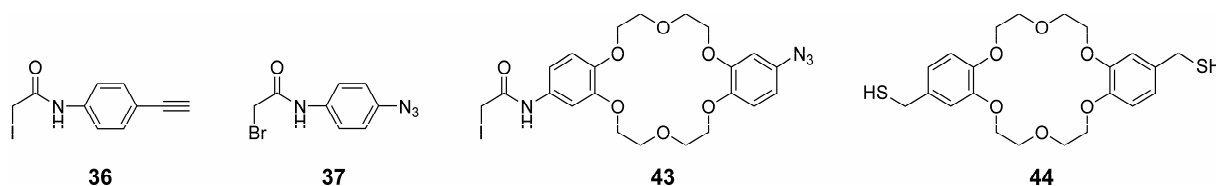


Abbildung 44: Reagenzien für eine Zweipunktaufhängung eines Kronenetherderivats in der OmpF-Pore.

Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen der Azidgruppe und dem terminalen Alkin notwendig. Mit dieser Methode wäre es demnach möglich, chemische Reaktionen in der OmpF-Pore mit intakter dreidimensionaler Struktur kontrolliert durchzuführen. Außerdem sollte es möglich sein, nur ein Cystein mit einem Reagenz wie **36** oder **37** (Abbildung 44 und Kapitel 4.3.4) zu modifizieren, das eine zur Sulfhydrylgruppe orthogonale Funktionalität in die Pore einführt. Dann wären in den rückgefalteten Poren neben Cystein-Konjugationsreaktionen durch die eingeführten Alkin- oder Azidfunktionen auch Click-Reaktionen oder Staudinger-Ligationen parallel durchführbar. Eine ungerichtete Anknüpfung könnte unter anderem mit Hilfe von Dithiolen wie **44** (Abbildung 44) über die Ausbildung von Disulfidbrücken unter oxidativen Bedingungen erfolgen.

5.5 Alternativer Zugang über *Native Chemical Ligation*

Eine alternative Syntheseroute zur Erzeugung modifizierter OmpF-Ionenkanäle wurde von Simon Reitz und Menekşe Çebi realisiert [181,185,219]. Sie stellten die Sequenz der ersten 26 Aminosäuren von OmpF, die dem ersten komplett die Membran durchspannenden β -Faltblatt entsprach (vgl. Abbildung 28), mittels Festphasen-Peptidsynthese nach der Fmoc-Variante her. Auf diesem Weg war es möglich an Position 16 die unnatürliche Aminosäure *O*-Propargyl-L-Tyrosin **II** einzuführen. Das Peptid **45** wurde als Ethylthioester zur *Native Chemical Ligation* (Kapitel 1.3.1) mit dem rekombinant hergestellten Fragment OmpF(27-340) N27C (**27**) eingesetzt, das am N-Terminus eine Asn27Cys-Mutation enthielt (Abbildung 45). Der stabile C-terminale Ethylthioester wurde durch Behandlung des an den Seitenketten geschützten Peptids mit HOBt/EDC und Ethanthiol erhalten. Die *Native Chemical Ligation* lieferte unter denaturierenden Bedingungen und mit Hilfe des Katalysators 4-Mercapto-phenylessigsäure (MPAA) das Ligationsprodukt **46** mit Ausbeuten von etwa 50 %. Die terminale Alkinfunktion der Propargylgruppe konnte darüber hinaus ausgenutzt werden, um mit dem Dansylazid **47** in einer Cu(I)-katalysierten Click-Reaktion umgesetzt zu werden. Auf diese Weise konnte das OmpF-Derivat **46-Dan** erhalten werden, das nach Rückfaltung fluoreszierende OmpF-Poren bildete. Die Syntheseroute erlaubte die Durchführung der Click-Reaktion auf der Stufe des Peptids, des denaturierten OmpF-Ligationsprodukts oder im rückgefalteten trimeren Zustand. Ausbeuten von über 90 % wurden allerdings nur unter denaturierenden Bedingungen erhalten.

Dieser Ansatz besitzt aufgrund der Möglichkeit, das immer weiter wachsende Repertoire der unnatürlichen Aminosäuren auszuschöpfen, ein enormes Potential. Die umgesetzte Kombination mit der 1,3-dipolaren Cycloaddition stellt eine interessante

Alternative zur Anknüpfung von Modifikationen durch Cystein-Konjugation dar. Denn Letztere ist aufgrund des essentiellen Cysteins an der Ligationstelle nur in Ausnahmefällen möglich. Die unter Umständen sehr aufwendige Festphasen-Peptidsynthese und Generierung des C-terminalen Thioesters sowie die benötigten hohen Reaktantenkonzentrationen dürfen bei der Syntheserplanung nicht vernachlässigt werden.

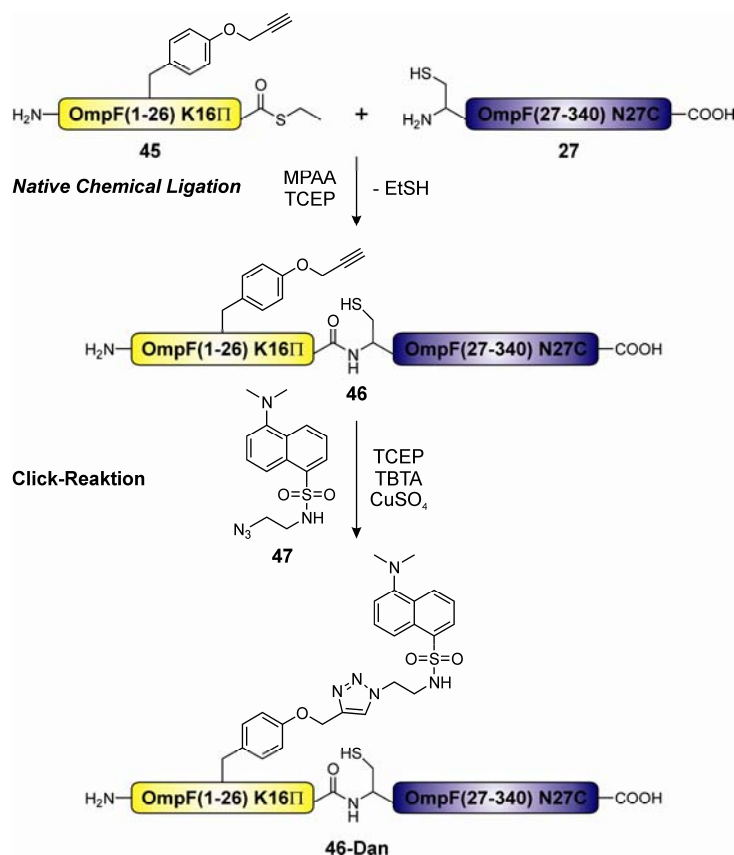


Abbildung 45: Konstruktion einer modifizierten OmpF-Pore durch *Native Chemical Ligation* und Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition. Das Thioesterpeptid **45** enthält an Position 16 einen *O*-Propargyltyrosinrest (**II**). 4-Mercaptophenylelessigsäure (MPAA) aktiviert durch Transthioesterifizierung den reaktionsträgen Ethylthioester für den Angriff der Sulphydrylgruppe des N-terminalen Cystein von **27**. Tris-(benzyltriazolylmethyl)-amin (TBTA) komplexiert und stabilisiert Cu(I)-Ionen für die Click-Reaktion zwischen dem Propargyltyrosinrest von **46** und 2-Azido-1-*N*-dansylethylamin **47**. Reproduziert nach [219].

5.6 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten grundlegenden Konzepte besitzen das Potential, in unterschiedlichste Richtungen weiterentwickelt zu werden und als Grundlage innovativer Anwendungen zu dienen. Um einen Eindruck zu gewinnen sollen im Folgenden einige der vielfältigen Möglichkeiten skizziert werden.

Ein erfolgreiches Beispiel zur Anwendung der Protein *trans*-Spleißreaktion wurde bereits bei der Beschreibung der Cys-Tag-Technologie in Kapitel 1.2.3 geliefert, die auf der beschriebenen Charakterisierung des *Ssp* DnaB Inteins aufbaute und unter anderem dazu

genutzt wurde, um an therapeutische Proteine zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften Polyethylenglykol-Einheiten anzuhängen [57,73]. Vor diesem Hintergrund trägt das *Psp*-GBD Pol Intein zur deutlichen Erweiterung dieses Ansatzes bei, indem Modifikationen von zwei Cysteinresten unabhängig voneinander auf chemo- und regioselektive Weise innerhalb des gesamten Proteins prinzipiell möglich werden. Zudem ist eine denaturierende Präparation für viele Proteine essentiell. Dies kann in Ergänzung zum *Npu* DnaE Intein auch für segmentelle Isotopenmarkierungen im Rahmen von NMR Untersuchungen von Interesse sein. Für den Einsatz des *Ssp* DnaB Inteins spricht dagegen der deutlich schnellere Reaktionsverlauf. Zudem könnte versucht werden, ebenfalls eine Cystein-freie N-terminale Inteinhälfte zu konstruieren oder das semisynthetische Protein *trans*-Spleißen zum Einbau unnatürlicher Funktionalitäten zu nutzen [68]. Insgesamt stellt die Natur durch die große Anzahl von Inteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften ein großes Repertoire zum Design weiterer semisynthetischer Ansätze zur Verfügung, die unter diversen Bedingungen eingesetzt oder für diese durch Proteinevolution optimiert werden können.

Die Gruppe der Porine ist aufgrund ihrer weiten und relativ unselektiven Poren sowie ihrer natürlichen Robustheit Gegenstand intensiver Forschung. Dabei kommen unter anderem verschiedene *Protein Engineering* Methoden zur Modulation der Kanaleigenschaften, zur Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sowie zur Etablierung neuer Funktionalitäten zum Einsatz. Die hier beschriebenen Konzepte zum semisynthetischen Zugang mehrfach modifizierter OmpF-Poren erweitern die Präparationsmöglichkeiten über gerichtete Mutagenese und einfache Cystein-Konjugation hinaus beträchtlich und eröffnen neue Perspektiven für wichtige Anwendungsgebiete von Transmembranproteinen.

Zum tieferen Verständnis der Funktionsweise der Porine bietet die Ausnutzung von zwei regioselektiv adressierbaren Cysteinresten die Möglichkeit, zwei Chromophore durch Cystein-Modifikation an nahezu beliebiger Position innerhalb der Proteine einzubauen. Durch Messung des *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) zwischen den beiden Chromophoren kann die Dynamik innerhalb der Pore verfolgt werden, was aufschlussreiche Einblicke in den Schließmechanismus verspricht. Zudem können auf gerichtete Weise Querverbindungen eingeführt werden, die entweder zur mechanischen Kopplung oder zur Fixierung bestimmter Strukturelemente dienen können, um konformationelle Umorientierungen zu beeinträchtigen. Das Auffinden potentieller Bindungsstellen für Substanzen, die den Kanal bevorzugt passieren, könnte durch semisynthetisch eingebrachte physikalische Sonden erleichtert werden. Unter Umständen können auf diese Weise sogar neue Bindungsstellen geschaffen werden.

Neben der Größe der Poren trägt die Möglichkeit zur Einzelkanalanalytik beträchtlich zum Interesse an den Porinen bei. Denn nach dieser Methode lassen sich Vorgänge innerhalb einzelner Kanäle mit molekularer Auflösung verfolgen. Dies begründet den Wert der Porine für die Biosensorik. Ähnlich wie bei Hämolysin könnten auch in der OmpF-Pore Adaptermoleküle kovalent angeknüpft werden, um Effektoren durch die von ihnen hervorgerufene Beeinträchtigung der Leitungseigenschaften zu detektieren und zu charakterisieren (*Stochastic Sensing*, Kapitel 1.5). Mit diesen Messungen wären unter anderem kinetische Parameter der Assoziation und Dissoziation sowie die Bestimmung der Affinität der Bindungspartner zugänglich. Durch Verwendung poröser Materialien mit Porenweiten im mittleren Nanometerbereich können Lipidmembranen auch auf feste Oberflächen aufgezogen werden (Nano-BLM), die zur Charakterisierung von OmpF bereits erfolgreich eingesetzt wurden [220]. Zur Zweipunktaufhängung von Adaptoren mit definierter Orientierung ist der vorgestellte Intein-basierte Ansatz sehr erfolgversprechend.

Das Erreichen einer effektiven Kontrolle der Öffnungs- und Schließeeigenschaften einer weiten Pore wie OmpF würde den Weg für Anwendungen als Nanoventil ebnen. Dazu müsste zunächst ein stabiler vollständig geschlossener Zustand etabliert werden, der durch ein externes Signal induziert in eine offene Konformation wechselt. Um dies zu erreichen, könnte die Pore durch Retinal-, Azobenzol-, Hemithioindigo- oder Spiropyranverbindungen sowie Nitrobenzylgruppen verschlossen werden. Nach Lichteinstrahlung könnte der Leitungsweg der Pore durch Isomerisierung, Ladungstrennung oder Abspaltung der Modulatoren zum Teil wieder freigegeben werden. In Liposomen verpackte Wirkstoffe könnten auf diesem Weg durch Bestrahlung ortsspezifisch freigesetzt werden. Des Weiteren können Nanoreaktoren innerhalb von Liposomen durch konstruierte Porine kontrolliert werden [221]. Diskrete offene und geschlossene Konformationen von Ionenkanälen sowie kontrollierbare Wechsel zwischen ihnen wären auch für die Neurowissenschaften zur Beeinflussung von Nervensignalen von Interesse. Ideal wäre zudem die Kombination mit künstlich geschaffenen Selektivitäten sowie einer praktisch nutzbaren Spannungsabhängigkeit des Schließverhaltens. Prominente Vorbilder auf diesem Gebiet sind die Rhodopsine [222]. Mögliche weitere Kandidaten wären die spannungsabhängigen, Anionen-selektiven Porine (VDACs) der äußeren Membran von Mitochondrien. Diese sind in der Lage, sich posttranslational und durch Chaperone stabilisiert auf spontane Weise in die Cytoplasmamembran eukaryotischer Zellen einzubauen [223]. Unter Umständen könnte diese Eigenschaft ausgenutzt werden, um sie nach heterologer Expression und Modifikation in der Cytoplasmamembran verschiedener Zellen zu rekonstituieren. Der Einsatz von OmpF in der Nanoelektronik wurde durch das Design einer

Nanodiode ermöglicht, die auf der Manipulation der Ladungsverteilung an der Engstelle und im extrazellulären Vestibül beruhte [224]. Eine neue wertvolle Methode zur Einzelkanalanalyse wurde durch die Verwendung von Tröpfchen einer wässrigen Ionenkanallösung in einer umgebenden Lipid-Öl-Mischungen etabliert. Dieses Zweiphasensystem führte zur Ausbildung einer einfachen Lipidschicht an der Phasengrenzfläche. Durch bewegliche Mikroelektroden konnten die Tröpfchen in räumliche Nähe gebracht werden, so dass an der Kontaktfläche eine Lipiddoppelschicht (*droplet interface bilayer*) entstand, die zur elektrophysiologischen Analyse einer Vielzahl von Kanälen geeignet ist [225]. Die Tropfen konnten schließlich zu Netzwerken und komplexeren Schaltkreisen angeordnet oder zum automatisierten *Screening* einer großen Anzahl von Proben genutzt werden. Durch geeignete Modifikationen innerhalb der eingesetzten Kanäle könnten neue nanoelektronische Bauelemente entwickelt werden.

Weitere attraktive Ansätze zur Kontrolle der Kanalaktivität wäre die Kopplung mit einer Effektdomäne oder einem Rezeptor, so dass ein Ligand-abhängiges Verhalten erreicht werden könnte. Zudem könnte eine weitere Domäne im Bereich der kurzen Kehren am periplasmatischen Ende als Deckel dienen und auf kontrollierte Weise den Kanal verschließen. Durch Beeinflussung der L2 Schleife, die zur Stabilisierung der Trimerstruktur in die benachbarte Pore hineingreift, könnte in Kombination mit elektrostatischer Abstoßung versucht werden, die Trennung der Trimere zu erreichen, wodurch die Ionenkanalaktivität wahrscheinlich zerstört würde. Als Grundlage könnten die Erkenntnisse dienen, die bei der Beobachtung monomerer und dimerer Intermediate während des Faltungsvorgangs gewonnen wurden. Eine reversible Störung könnte die Wiederherstellung der Aktivität ermöglichen.

Es wäre überdies in höchstem Maße wünschenswert, wenn die gewonnen Einblicke und neu entwickelten Konzepte ebenso auf die deutlich größere Zahl α -helicaler Poren und Rezeptorproteine übertragbar wären. Damit könnten weitere Schritte zu einem besseren Verständnis physiologisch relevanter Transportvorgänge oder Signaltransduktionswege sowie damit verbundener Dysfunktionen im menschlichen Körper ermöglicht werden, die für die Wirkstoffentwicklung fundamental wichtig sind.

Literatur

1. Noren, C. J., Wang, J. und Perler, F. B. *Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and Its Applications*. Angew Chem Int Ed Engl, **2000**, 39, S. 450-466.
2. Paulus, H. *Protein splicing and related forms of protein autoprocessing*. Annu Rev Biochem, **2000**, 69, S. 447-496.
3. Perler, F. B., Davis, E. O., Dean, G. E., Gimble, F. S., Jack, W. E., Neff, N., Noren, C. J., Thorner, J. und Belfort, M. *Protein splicing elements: inteins and exteins--a definition of terms and recommended nomenclature*. Nucleic Acids Res, **1994**, 22, S. 1125-1127.
4. Kane, P. M., Yamashiro, C. T., Wolczyk, D. F., Neff, N., Goebel, M. und Stevens, T. H. *Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H⁺-adenosine triphosphatase*. Science, **1990**, 250, S. 651-657.
5. Hirata, R., Ohsumi, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K. und Anraku, Y. *Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H⁺-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, **1990**, 265, S. 6726-6733.
6. Pietrokovski, S. *Conserved sequence features of inteins (protein introns) and their use in identifying new inteins and related proteins*. Protein Sci, **1994**, 3, S. 2340-2350.
7. Perler, F. B., Olsen, G. J. und Adam, E. *Compilation and analysis of intein sequences*. Nucleic Acids Res, **1997**, 25, S. 1087-1093.
8. Pietrokovski, S. *Modular organization of inteins and C-terminal autocatalytic domains*. Protein Sci, **1998**, 7, S. 64-71.
9. Dalgaard, J. Z., Moser, M. J., Hughey, R. und Mian, I. S. *Statistical modeling, phylogenetic analysis and structure prediction of a protein splicing domain common to inteins and hedgehog proteins*. J Comput Biol, **1997**, 4, S. 193-214.
10. Gorbalenya, A. E. *Non-canonical inteins*. Nucleic Acids Res, **1998**, 26, S. 1741-1748.
11. Perler, F. B. *InBase: the InteIn Database*. Nucleic Acids Res, **2002**, 30, S. 383-384 (www.neb.com/neb/inteins.html).
12. Belfort, M. und Roberts, R. J. *Homing endonucleases: keeping the house in order*. Nucleic Acids Res, **1997**, 25, S. 3379-3388.
13. Gogarten, J. P., Senejani, A. G., Zhaxybayeva, O., Olendzenski, L. und Hilario, E. *Inteins: structure, function, and evolution*. Annu Rev Microbiol, **2002**, 56, S. 263-287.
14. Liu, X. Q., Yang, J. und Meng, Q. *Four inteins and three group II introns encoded in a bacterial ribonucleotide reductase gene*. J Biol Chem, **2003**, 278, S. 46826-46831.
15. Evans, T. C., Jr., Benner, J. und Xu, M. Q. *The in vitro ligation of bacterially expressed proteins using an intein from Methanobacterium thermoautotrophicum*. J Biol Chem, **1999**, 274, S. 3923-3926.
16. Liu, X. Q. *Protein-splicing intein: Genetic mobility, origin, and evolution*. Annu Rev Genet, **2000**, 34, S. 61-76.
17. Xu, M. Q., Southworth, M. W., Mersha, F. B., Hornstra, L. J. und Perler, F. B. *In vitro protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate*. Cell, **1993**, 75, S. 1371-1377.
18. Chong, S., Shao, Y., Paulus, H., Benner, J., Perler, F. B. und Xu, M. Q. *Protein splicing involving the Saccharomyces cerevisiae VMA intein. The steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an in vitro splicing system*. J Biol Chem, **1996**, 271, S. 22159-22168.
19. Evans, T. C. und Xu, M. Q. *Mechanistic and kinetic considerations of protein splicing*. Chem Rev, **2002**, 102, S. 4869-4884.
20. Xu, M. Q. und Perler, F. B. *The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation*. Embo J, **1996**, 15, S. 5146-5153.
21. Xu, M. Q., Comb, D. G., Paulus, H., Noren, C. J., Shao, Y. und Perler, F. B. *Protein splicing: an analysis of the branched intermediate and its resolution by succinimide formation*. Embo J, **1994**, 13, S. 5517-5522.
22. Shao, Y., Xu, M. Q. und Paulus, H. *Protein splicing: characterization of the aminosuccinimide residue at the carboxyl terminus of the excised intervening sequence*. Biochemistry, **1995**, 34, S. 10844-10850.
23. Southworth, M. W., Benner, J. und Perler, F. B. *An alternative protein splicing mechanism for inteins lacking an N-terminal nucleophile*. Embo J, **2000**, 19, S. 5019-5026.
24. Duan, X., Gimble, F. S. und Quirocho, F. A. *Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity*. Cell, **1997**, 89, S. 555-564.
25. Pietrokovski, S. *A new intein in cyanobacteria and its significance for the spread of inteins*. Trends Genet, **1996**, 12, S. 287-288.
26. Chong, S. und Xu, M. Q. *Protein splicing of the Saccharomyces cerevisiae VMA intein without the endonuclease motifs*. J Biol Chem, **1997**, 272, S. 15587-15590.
27. Wu, H., Xu, M. Q. und Liu, X. Q. *Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial dnaB intein*. Biochim Biophys Acta, **1998**, 1387, S. 422-432.

28. Ding, Y., Xu, M. Q., Ghosh, I., Chen, X., Ferrandon, S., Lesage, G. und Rao, Z. *Crystal structure of a mini-intein reveals a conserved catalytic module involved in side chain cyclization of asparagine during protein splicing*. J Biol Chem, **2003**, 278, S. 39133-39142.
29. Telenti, A., Southworth, M., Alcaide, F., Daugelat, S., Jacobs, W. R., Jr. und Perler, F. B. *The Mycobacterium xenopi GyrA protein splicing element: characterization of a minimal intein*. J Bacteriol, **1997**, 179, S. 6378-6382.
30. Klabunde, T., Sharma, S., Telenti, A., Jacobs, W. R., Jr. und Sacchettini, J. C. *Crystal structure of GyrA intein from Mycobacterium xenopi reveals structural basis of protein splicing*. Nat Struct Biol, **1998**, 5, S. 31-36.
31. Romanelli, A., Shekhtman, A., Cowburn, D. und Muir, T. W. *Semisynthesis of a segmental isotopically labeled protein splicing precursor: NMR evidence for an unusual peptide bond at the N-extein-intein junction*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2004**, 101, S. 6397-6402.
32. Poland, B. W., Xu, M. Q. und Quioco, F. A. *Structural insights into the protein splicing mechanism of PI-SceI*. J Biol Chem, **2000**, 275, S. 16408-16413.
33. Mizutani, R., Nogami, S., Kawasaki, M., Ohya, Y., Anraku, Y. und Satow, Y. *Protein-splicing reaction via a thiazolidine intermediate: crystal structure of the VMA1-derived endonuclease bearing the N and C-terminal propeptides*. J Mol Biol, **2002**, 316, S. 919-929.
34. Wu, H., Hu, Z. und Liu, X. Q. *Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of Synechocystis sp. PCC6803*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1998**, 95, S. 9226-9231.
35. Caspi, J., Amitai, G., Belenkiy, O. und Pietrokovski, S. *Distribution of split DnaE inteins in cyanobacteria*. Mol Microbiol, **2003**, 50, S. 1569-1577.
36. Dassa, B., Amitai, G., Caspi, J., Schueler-Furman, O. und Pietrokovski, S. *Trans protein splicing of cyanobacterial split inteins in endogenous and exogenous combinations*. Biochemistry, **2007**, 46, S. 322-330.
37. Iwai, H., Züger, S., Jin, J. und Tam, P. H. *Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from Nostoc punctiforme*. FEBS Lett, **2006**, 580, S. 1853-1858.
38. Zettler, J., Schutz, V. und Mootz, H. D. *The naturally split Npu DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction*. FEBS Lett, **2009**, 583, S. 909-914.
39. Choi, J. J., Nam, K. H., Min, B., Kim, S. J., Soll, D. und Kwon, S. T. *Protein trans-splicing and characterization of a split family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeal parasite Nanoarchaeum equitans*. J Mol Biol, **2006**, 356, S. 1093-1106.
40. Ozawa, T., Kaihara, A., Sato, M., Tachihara, K. und Umezawa, Y. *Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing*. Anal Chem, **2001**, 73, S. 2516-2521.
41. Chin, H. G., Kim, G. D., Marin, I., Mersha, F., Evans, T. C., Jr., Chen, L., Xu, M. Q. und Pradhan, S. *Protein trans-splicing in transgenic plant chloroplast: reconstruction of herbicide resistance from split genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2003**, 100, S. 4510-4515.
42. Kim, S. B., Ozawa, T., Watanabe, S. und Umezawa, Y. *High-throughput sensing and noninvasive imaging of protein nuclear transport by using reconstitution of split Renilla luciferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2004**, 101, S. 11542-11547.
43. Scott, C. P., Abel-Santos, E., Wall, M., Wahnou, D. C. und Benkovic, S. J. *Production of cyclic peptides and proteins in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1999**, 96, S. 13638-13643.
44. Kwon, Y., Coleman, M. A. und Camarero, J. A. *Selective immobilization of proteins onto solid supports through split-intein-mediated protein trans-splicing*. Angew Chem Int Ed Engl, **2006**, 45, S. 1726-1729.
45. Giriat, I. und Muir, T. W. *Protein semi-synthesis in living cells*. J Am Chem Soc, **2003**, 125, S. 7180-7181.
46. Shi, J. und Muir, T. W. *Development of a tandem protein trans-splicing system based on native and engineered split inteins*. J Am Chem Soc, **2005**, 127, S. 6198-6206.
47. Derbyshire, V., Wood, D. W., Wu, W., Dansereau, J. T., Dalggaard, J. Z. und Belfort, M. *Genetic definition of a protein-splicing domain: functional mini-inteins support structure predictions and a model for intein evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1997**, 94, S. 11466-11471.
48. Shingledecker, K., Jiang, S. Q. und Paulus, H. *Molecular dissection of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein: design of a minimal intein and of a trans-splicing system involving two intein fragments*. Gene, **1998**, 207, S. 187-195.
49. Mills, K. V., Lew, B. M., Jiang, S. und Paulus, H. *Protein splicing in trans by purified N- and C-terminal fragments of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1998**, 95, S. 3543-3548.
50. Williams, N. K., Prosser, P., Liepinsh, E., Line, I., Sharipo, A., Littler, D. R., Curmi, P. M., Otting, G. und Dixon, N. E. *In vivo protein cyclization promoted by a circularly permuted Synechocystis sp. PCC6803 DnaB mini-intein*. J Biol Chem, **2002**, 277, S. 7790-7798.
51. Siebold, C. und Erni, B. *Intein-mediated cyclization of a soluble and a membrane protein in vivo: function and stability*. Biophys Chem, **2002**, 96, S. 163-171.

52. Southworth, M. W., Adam, E., Panne, D., Byer, R., Kautz, R. und Perler, F. B. *Control of protein splicing by intein fragment reassembly*. *Embo J*, **1998**, 17, S. 918-926.
53. Yamazaki, T., Otomo, T., Oda, N., Kyogoku, Y., Uegaki, K., Ito, N., Ishino, Y. und Nakamura, H. *Segmental isotope labeling for protein NMR using peptide splicing*. *J Am Chem Soc*, **1998**, 120, S. 5591-5592.
54. Otomo, T., Ito, N., Kyogoku, Y. und Yamazaki, T. *NMR observation of selected segments in a larger protein: central-segment isotope labeling through intein-mediated ligation*. *Biochemistry*, **1999**, 38, S. 16040-16044.
55. Iwai, H., Lingel, A. und Plückthun, A. *Cyclic green fluorescent protein produced in vivo using an artificially split PI-Pful intein from Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*, **2001**, 276, S. 16548-16554.
56. Fitzsimons Hall, M., Noren, C. J., Perler, F. B. und Schildkraut, I. *Creation of an artificial bifunctional intein by grafting a homing endonuclease into a mini-intein*. *J Mol Biol*, **2002**, 323, S. 173-179.
57. Kurpiers, T. und Mootz, H. D. *Site-specific chemical modification of proteins with a prelabelled cysteine tag using the artificially split Mxe GyrA intein*. *Chembiochem*, **2008**, 9, S. 2317-2325.
58. Elleuche, S. und Poggeler, S. *Trans-splicing of an artificially split fungal mini-intein*. *Biochem Biophys Res Commun*, **2007**, 355, S. 830-834.
59. Ozawa, T., Nogami, S., Sato, M., Ohya, Y. und Umezawa, Y. *A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions in vivo based on protein splicing*. *Anal Chem*, **2000**, 72, S. 5151-5157.
60. Ho, S. N., Biggar, S. R., Spencer, D. M., Schreiber, S. L. und Crabtree, G. R. *Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation*. *Nature*, **1996**, 382, S. 822-826.
61. Schreiber, S. L. *Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry*. *Bioorg Med Chem*, **1998**, 6, S. 1127-1152.
62. Mootz, H. D. und Muir, T. W. *Protein splicing triggered by a small molecule*. *J Am Chem Soc*, **2002**, 124, S. 9044-9045.
63. Mootz, H. D., Blum, E. S., Tyszkiewicz, A. B. und Muir, T. W. *Conditional protein splicing: a new tool to control protein structure and function in vitro and in vivo*. *J Am Chem Soc*, **2003**, 125, S. 10561-10569.
64. Brenzel, S. *Entwicklung eines Ligand-inaktivierbaren Inteins zur Kontrolle des Protein-Spleißens in trans*. Diplomarbeit, **2004**, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg, Bibliothek Chemie: X 2452
65. Brenzel, S. und Mootz, H. D. *Design of an intein that can be inhibited with a small molecule ligand*. *J Am Chem Soc*, **2005**, 127, S. 4176-4177.
66. Tyszkiewicz, A. B. und Muir, T. W. *Activation of protein splicing with light in yeast*. *Nat Methods*, **2008**, 5, S. 303-305.
67. Sun, W., Yang, J. und Liu, X. Q. *Synthetic two-piece and three-piece split inteins for protein trans-splicing*. *J Biol Chem*, **2004**, 279, S. 35281-35286.
68. Ludwig, C., Pfeiff, M., Linne, U. und Mootz, H. D. *Ligation of a synthetic peptide to the N terminus of a recombinant protein using semisynthetic protein trans-splicing*. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**, 45, S. 5218-5221.
69. Ando, T., Tsukiji, S., Tanaka, T. und Nagamune, T. *Construction of a small-molecule-integrated semisynthetic split intein for in vivo protein ligation*. *Chem Commun (Camb)*, **2007**, S. 4995-4997.
70. Appleby, J. H., Zhou, K., Volkmann, G. und Liu, X. Q. *Novel Split Intein for trans-Splicing Synthetic Peptide onto C Terminus of Protein*. *J Biol Chem*, **2009**, 284, S. 6194-6199.
71. Lew, B. M., Mills, K. V. und Paulus, H. *Protein splicing in vitro with a semisynthetic two-component minimal intein*. *J Biol Chem*, **1998**, 273, S. 15887-15890.
72. Evans, T. C., Jr., Martin, D., Kolly, R., Panne, D., Sun, L., Ghosh, I., Chen, L., Benner, J., Liu, X. Q. und Xu, M. Q. *Protein trans-splicing and cyclization by a naturally split intein from the dnaE gene of Synechocystis species PCC6803*. *J Biol Chem*, **2000**, 275, S. 9091-9094.
73. Kurpiers, T. und Mootz, H. D. *Regioselective cysteine bioconjugation by appending a labeled cysteine tag to a protein by using protein splicing in trans*. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2007**, 46, S. 5234-5237.
74. Hackenberger, C. P. und Schwarzer, D. *Chemoselective ligation and modification strategies for peptides and proteins*. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2008**, 47, S. 10030-10074.
75. Muir, T. W., Sondhi, D. und Cole, P. A. *Expressed protein ligation: a general method for protein engineering*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, 95, S. 6705-6710.
76. Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I. und Kent, S. B. *Synthesis of proteins by native chemical ligation*. *Science*, **1994**, 266, S. 776-779.
77. Muralidharan, V. und Muir, T. W. *Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins*. *Nat Methods*, **2006**, 3, S. 429-438.
78. Yan, L. Z. und Dawson, P. E. *Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization*. *J Am Chem Soc*, **2001**, 123, S. 526-533.
79. Quaderer, R. und Hilvert, D. *Selenocysteine-mediated backbone cyclization of unprotected peptides followed by alkylation, oxidative elimination or reduction of the selenol*. *Chem Commun (Camb)*, **2002**, S. 2620-2621.

80. Tam, J. P. und Yu, Q. *Methionine ligation strategy in the biomimetic synthesis of parathyroid hormones*. Biopolymers, **1998**, 46, S. 319-327.
81. Offer, J., Boddy, C. N. und Dawson, P. E. *Extending synthetic access to proteins with a removable acyl transfer auxiliary*. J Am Chem Soc, **2002**, 124, S. 4642-4646.
82. Chatterjee, C., McGinty, R. K., Pellois, J. P. und Muir, T. W. *Auxiliary-mediated site-specific peptide ubiquitylation*. Angew Chem Int Ed Engl, **2007**, 46, S. 2814-2818.
83. Brik, A., Yang, Y. Y., Ficht, S. und Wong, C. H. *Sugar-assisted glycopeptide ligation*. J Am Chem Soc, **2006**, 128, S. 5626-5627.
84. Bang, D. und Kent, S. B. *A one-pot total synthesis of crambin*. Angew Chem Int Ed Engl, **2004**, 43, S. 2534-2538.
85. Bang, D., Pentelute, B. L. und Kent, S. B. *Kinetically controlled ligation for the convergent chemical synthesis of proteins*. Angew Chem Int Ed Engl, **2006**, 45, S. 3985-3988.
86. Muir, T. W. *Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation*. Annu Rev Biochem, **2003**, 72, S. 249-289.
87. Schwarzer, D. und Cole, P. A. *Protein semisynthesis and expressed protein ligation: chasing a protein's tail*. Curr Opin Chem Biol, **2005**, 9, S. 561-569.
88. Flavell, R. R. und Muir, T. W. *Expressed protein ligation (EPL) in the study of signal transduction, ion conduction, and chromatin biology*. Acc Chem Res, **2009**, 42, S. 107-116.
89. Kent, S. B. *Total chemical synthesis of proteins*. Chem Soc Rev, **2009**, 38, S. 338-351.
90. Staudinger, H. und Meyer, J. *Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate und Phosphinimine*. Helv Chim Acta, **1919**, 2, S. 635-646.
91. Saxon, E. und Bertozzi, C. R. *Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction*. Science, **2000**, 287, S. 2007-2010.
92. Saxon, E., Armstrong, J. I. und Bertozzi, C. R. *A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds*. Org Lett, **2000**, 2, S. 2141-2143.
93. Nilsson, B. L., Kiessling, L. L. und Raines, R. T. *Staudinger ligation: a peptide from a thioester and azide*. Org Lett, **2000**, 2, S. 1939-1941.
94. Nilsson, B. L., Kiessling, L. L. und Raines, R. T. *High-yielding Staudinger ligation of a phosphinothioester and azide to form a peptide*. Org Lett, **2001**, 3, S. 9-12.
95. Tam, A., Soellner, M. B. und Raines, R. T. *Water-soluble phosphinothiols for traceless staudinger ligation and integration with expressed protein ligation*. J Am Chem Soc, **2007**, 129, S. 11421-11430.
96. Nilsson, B. L., Hondal, R. J., Soellner, M. B. und Raines, R. T. *Protein assembly by orthogonal chemical ligation methods*. J Am Chem Soc, **2003**, 125, S. 5268-5269.
97. Bordusa, F. *Proteases in organic synthesis*. Chem Rev, **2002**, 102, S. 4817-4868.
98. Schellenberger, V. und Jakubke, H.-D. *Proteasekatalysierte kinetisch kontrollierte Peptidsynthese*. Angew Chem Int Ed Engl, **1991**, 30, S. 1437-1449.
99. Abrahmsen, L., Tom, J., Burnier, J., Butcher, K. A., Kossiakoff, A. und Wells, J. A. *Engineering subtilisin and its substrates for efficient ligation of peptide bonds in aqueous solution*. Biochemistry, **1991**, 30, S. 4151-4159.
100. Jackson, D. Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J. und Wells, J. A. *A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues*. Science, **1994**, 266, S. 243-247.
101. Machova, Z., von Eggelkraut-Gottanka, R., Wehofsky, N., Bordusa, F. und Beck-Sickinger, A. G. *Expressed enzymatic ligation for the semisynthesis of chemically modified proteins*. Angew Chem Int Ed Engl, **2003**, 42, S. 4916-4918.
102. Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H. und Schneewind, O. *Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall*. Science, **1999**, 285, S. 760-763.
103. Tsukiji, S. und Nagamune, T. *Sortase-mediated ligation: a gift from Gram-positive bacteria to protein engineering*. Chembiochem, **2009**, 10, S. 787-798.
104. Mao, H., Hart, S. A., Schink, A. und Pollok, B. A. *Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering*. J Am Chem Soc, **2004**, 126, S. 2670-2671.
105. Popp, M. W., Antos, J. M., Grotenbreg, G. M., Spooner, E. und Ploegh, H. L. *Sortagging: a versatile method for protein labeling*. Nat Chem Biol, **2007**, 3, S. 707-708.
106. Hermanson, G. T. *Bioconjugate techniques*, **2008**, Elsevier.
107. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. und Sharpless, K. B. *A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes*. Angew Chem Int Ed Engl, **2002**, 41, S. 2596-2599.
108. Tornøe, C. W., Christensen, C. und Meldal, M. *Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides*. J Org Chem, **2002**, 67, S. 3057-3064.
109. Agard, N. J., Prescher, J. A. und Bertozzi, C. R. *A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems*. J Am Chem Soc, **2004**, 126, S. 15046-15047.

110. Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Codelli, J. A. und Bertozzi, C. R. *Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2007**, *104*, S. 16793-16797.
111. Song, W., Wang, Y., Qu, J., Madden, M. M. und Lin, Q. *A photoinducible 1,3-dipolar cycloaddition reaction for rapid, selective modification of tetrazole-containing proteins*. Angew Chem Int Ed Engl, **2008**, *47*, S. 2832-2835.
112. Song, W., Wang, Y., Qu, J. und Lin, Q. *Selective functionalization of a genetically encoded alkene-containing protein via "photoclick chemistry" in bacterial cells*. J Am Chem Soc, **2008**, *130*, S. 9654-9655.
113. Gaertner, H. F., Rose, K., Cotton, R., Timms, D., Camble, R. und Offord, R. E. *Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments*. Bioconjug Chem, **1992**, *3*, S. 262-268.
114. Rose, K. *Facile Synthesis of Homogeneous Artificial Proteins*. J Am Chem Soc, **1994**, *116*, S. 30-33.
115. Liu, C. F. und Tam, J. P. *Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1994**, *91*, S. 6584-6588.
116. Kurpiers, T. und Mootz, H. D. *Bioorthogonal ligation in the spotlight*. Angew Chem Int Ed Engl, **2009**, *48*, S. 1729-1731.
117. de Araujo, A. D., Palomo, J. M., Cramer, J., Kohn, M., Schroder, H., Wacker, R., Niemeyer, C., Alexandrov, K. und Waldmann, H. *Diels-Alder ligation and surface immobilization of proteins*. Angew Chem Int Ed Engl, **2005**, *45*, S. 296-301.
118. Blackman, M. L., Royzen, M. und Fox, J. M. *Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity*. J Am Chem Soc, **2008**, *130*, S. 13518-13519.
119. Wittrock, S., Becker, T. und Kunz, H. *Synthetic vaccines of tumor-associated glycopeptide antigens by immune-compatible thioether linkage to bovine serum albumin*. Angew Chem Int Ed Engl, **2007**, *46*, S. 5226-5230.
120. Lin, Y. A., Chalker, J. M., Floyd, N., Bernardes, G. J. und Davis, B. G. *Allyl sulfides are privileged substrates in aqueous cross-metathesis: application to site-selective protein modification*. J Am Chem Soc, **2008**, *130*, S. 9642-9643.
121. Lin, Y. A., Chalker, J. M. und Davis, B. G. *Olefin Metathesis for Site-Selective Protein Modification*. Chembiochem, **2009**, *10*, S. 959-969.
122. Bayley, H. und Jayasinghe, L. *Functional engineered channels and pores (Review)*. Mol Membr Biol, **2004**, *21*, S. 209-220.
123. Essen, L.-O. und Koert, U. *Ion-channel engineering*. Annu Rep Prog Chem, Sect. C: Phys Chem, **2008**, *104*, S. 165-188.
124. Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetschner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. und MacKinnon, R. *The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity*. Science, **1998**, *280*, S. 69-77.
125. Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. und MacKinnon, R. *Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution*. Nature, **2001**, *414*, S. 43-48.
126. Valiyaveetil, F. I., MacKinnon, R. und Muir, T. W. *Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA*. J Am Chem Soc, **2002**, *124*, S. 9113-9120.
127. Valiyaveetil, F. I., Sekedat, M., Muir, T. W. und MacKinnon, R. *Semisynthesis of a functional K^+ channel*. Angew Chem Int Ed Engl, **2004**, *43*, S. 2504-2507.
128. Valiyaveetil, F. I., Sekedat, M., MacKinnon, R. und Muir, T. W. *Structural and functional consequences of an amide-to-ester substitution in the selectivity filter of a potassium channel*. J Am Chem Soc, **2006**, *128*, S. 11591-11599.
129. Valiyaveetil, F. I., Sekedat, M., MacKinnon, R. und Muir, T. W. *Glycine as a D-amino acid surrogate in the K^+ -selectivity filter*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2004**, *101*, S. 17045-17049.
130. Valiyaveetil, F. I., Leonetti, M., Muir, T. W. und MacKinnon, R. *Ion selectivity in a semisynthetic K^+ channel locked in the conductive conformation*. Science, **2006**, *314*, S. 1004-1007.
131. Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D. und Kramer, R. H. *Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing*. Nat Neurosci, **2004**, *7*, S. 1381-1386.
132. Volgraf, M., Gorostiza, P., Numano, R., Kramer, R. H., Isacoff, E. Y. und Trauner, D. *Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch*. Nat Chem Biol, **2006**, *2*, S. 47-52.
133. Gorostiza, P., Volgraf, M., Numano, R., Szobota, S., Trauner, D. und Isacoff, E. Y. *Mechanisms of photoswitch conjugation and light activation of an ionotropic glutamate receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2007**, *104*, S. 10865-10870.
134. Szobota, S., Gorostiza, P., Del Bene, F., Wyart, C., Fortin, D. L., Kolstad, K. D., Tulyathan, O., Volgraf, M., Numano, R., Aaron, H. L., Scott, E. K., Kramer, R. H., Flannery, J., Baier, H., Trauner, D. und Isacoff, E. Y. *Remote control of neuronal activity with a light-gated glutamate receptor*. Neuron, **2007**, *54*, S. 535-545.
135. Koçer, A., Walko, M., Meijberg, W. und Feringa, B. L. *A light-actuated nanovalve derived from a channel protein*. Science, **2005**, *309*, S. 755-758.

136. Koçer, A., Walko, M., Bulten, E., Halza, E., Feringa, B. L. und Meijberg, W. *Rationally designed chemical modulators convert a bacterial channel protein into a pH-sensory valve*. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**, *45*, S. 3126-3130.
137. Gu, L. Q., Braha, O., Conlan, S., Cheley, S. und Bayley, H. *Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter*. *Nature*, **1999**, *398*, S. 686-690.
138. Wu, H. C., Astier, Y., Maglia, G., Mikhailova, E. und Bayley, H. *Protein nanopores with covalently attached molecular adapters*. *J Am Chem Soc*, **2007**, *129*, S. 16142-16148.
139. Bayley, H. und Cremer, P. S. *Stochastic sensors inspired by biology*. *Nature*, **2001**, *413*, S. 226-230.
140. Clarke, J., Wu, H. C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S. und Bayley, H. *Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing*. *Nat Nanotechnol*, **2009**, *4*, S. 265-270.
141. Kang, X. F., Cheley, S., Guan, X. und Bayley, H. *Stochastic detection of enantiomers*. *J Am Chem Soc*, **2006**, *128*, S. 10684-10685.
142. Shin, S. H., Steffensen, M. B., Claridge, T. D. und Bayley, H. *Formation of a chiral center and pyrimidal inversion at the single-molecule level*. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2007**, *46*, S. 7412-7416.
143. Cheley, S., Xie, H. und Bayley, H. *A genetically encoded pore for the stochastic detection of a protein kinase*. *Chembiochem*, **2006**, *7*, S. 1923-1927.
144. Chen, M., Khalid, S., Sansom, M. S. und Bayley, H. *Outer membrane protein G: Engineering a quiet pore for biosensing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2008**, *105*, S. 6272-6277.
145. Ketchum, R., Roux, B. und Cross, T. *High-resolution polypeptide structure in a lamellar phase lipid environment from solid state NMR derived orientational constraints*. *Structure*, **1997**, *5*, S. 1655-1669.
146. Chadwick, D. J. und Cardew, G. *Gramicidin and Related Ion Channel-Forming Peptides*, **1999**, Wiley.
147. Koert, U., Momani, L. A. und Pfeifer, J. R. *Synthetic Ion Channels*. *Synthesis*, **2004**, *8*, S. 1129-1146.
148. Eisenman, G. und Horn, R. *Ionic selectivity revisited: the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels*. *J Membr Biol*, **1983**, *76*, S. 197-225.
149. Pfeifer, J. R., Reiss, P. und Koert, U. *Crown ether-gramicidin hybrid ion channels: dehydration-assisted ion selectivity*. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**, *45*, S. 501-504.
150. Bradshaw, J. S., Izatt, R. M., Bordunov, A. V., Zhu, C. Y. und Hathaway, J. K. *Crown Ethers in Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 1*, J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle und G. W. Gokel (Editors), **1996**, Pergamon, S. 35-95.
151. Nikaïdo, H. *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2003**, *67*, S. 593-656.
152. Nikaïdo, H. *Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes*. *J Biol Chem*, **1994**, *269*, S. 3905-3908.
153. Yildiz, O., Vinothkumar, K. R., Goswami, P. und Kuhlbrandt, W. *Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation*. *Embo J*, **2006**, *25*, S. 3702-3713.
154. Koebnik, R., Locher, K. P. und Van Gelder, P. *Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell*. *Mol Microbiol*, **2000**, *37*, S. 239-253.
155. Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. und Rosenbusch, J. P. *Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins*. *Nature*, **1992**, *358*, S. 727-733.
156. Phale, P. S., Philippsen, A., Kiefhaber, T., Koebnik, R., Phale, V. P., Schirmer, T. und Rosenbusch, J. P. *Stability of trimeric OmpF porin: the contributions of the latching loop L2*. *Biochemistry*, **1998**, *37*, S. 15663-15670.
157. Benz, R., Janko, K. und Lauger, P. *Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1979**, *551*, S. 238-247.
158. Karshikoff, A., Spassov, V., Cowan, S. W., Ladenstein, R. und Schirmer, T. *Electrostatic properties of two porin channels from Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **1994**, *240*, S. 372-384.
159. Benz, R., Janko, K., Boos, W. und Lauger, P. *Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1978**, *511*, S. 305-319.
160. Schindler, H. und Rosenbusch, J. P. *Matrix protein from Escherichia coli outer membranes forms voltage-controlled channels in lipid bilayers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1978**, *75*, S. 3751-3755.
161. Delcour, A. H. *Function and modulation of bacterial porins: insights from electrophysiology*. *FEMS Microbiol Lett*, **1997**, *151*, S. 115-123.
162. Engel, A., Massalski, A., Schindler, H., Dorset, D. L. und Rosenbusch, J. P. *Porin channel triplets merge into single outlets in Escherichia coli outer membranes*. *Nature*, **1985**, *317*, S. 643-645.
163. Robertson, K. M. und Tieleman, D. P. *Molecular basis of voltage gating of OmpF porin*. *Biochem Cell Biol*, **2002**, *80*, S. 517-523.
164. Miedema, H., Meter-Arkema, A., Wierenga, J., Tang, J., Eisenberg, B., Nonner, W., Hektor, H., Gillespie, D. und Meijberg, W. *Permeation properties of an engineered bacterial OmpF porin containing the EEEE-locus of Ca²⁺ channels*. *Biophys J*, **2004**, *87*, S. 3137-3147.
165. Vroenenraets, M., Wierenga, J., Meijberg, W. und Miedema, H. *Chemical modification of the bacterial porin OmpF: gain of selectivity by volume reduction*. *Biophys J*, **2006**, *90*, S. 1202-1211.

166. Miedema, H., Vrouenraets, M., Wierenga, J., Gillespie, D., Eisenberg, B., Meijberg, W. und Nonner, W. *Ca²⁺ selectivity of a chemically modified OmpF with reduced pore volume.* Biophys J, **2006**, 91, S. 4392-4400.
167. Garavito, R. M. und Rosenbusch, J. P. *Isolation and crystallization of bacterial porin.* Methods Enzymol, **1986**, 125, S. 309-328.
168. Surrey, T., Schmid, A. und Jähnig, F. *Folding and membrane insertion of the trimeric beta-barrel protein OmpF.* Biochemistry, **1996**, 35, S. 2283-2288.
169. Baslé, A., Iyer, R. und Delcour, A. H. *Subconductance states in OmpF gating.* Biochim Biophys Acta, **2004**, 1664, S. 100-107.
170. Kong, H., Kucera, R. B. und Jack, W. E. *Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea Thermococcus litoralis. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and exonuclease activities.* J Biol Chem, **1993**, 268, S. 1965-1975.
171. Prilipov, A., Phale, P. S., Van Gelder, P., Rosenbusch, J. P. und Koebnik, R. *Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from E. coli.* FEMS Microbiol Lett, **1998**, 163, S. 65-72.
172. Sambrook, J. und Russel, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Third Edition, **2001**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
173. Birnboim, H. C. und Doly, J. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nucleic Acids Res, **1979**, 7, S. 1513-1523.
174. Vogelstein, B. und Gillespie, D. *Preparative and analytical purification of DNA from agarose.* Proc Natl Acad Sci U S A, **1979**, 76, S. 615-619.
175. Mullis, K. B. und Faloona, F. A. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.* Methods Enzymol, **1987**, 155, S. 335-350.
176. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, **1977**, 74, S. 5463-5467.
177. Braman, J., Papworth, C. und Greener, A. *Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates.* Methods Mol Biol, **1996**, 57, S. 31-44.
178. Brenzel, S., Kurpiers, T. und Mootz, H. D. *Engineering artificially split inteins for applications in protein chemistry: biochemical characterization of the split Ssp DnaB intein and comparison to the split Sce VMA intein.* Biochemistry, **2006**, 45, S. 1571-1578.
179. Forrer, P. und Jaussi, R. *High-level expression of soluble heterologous proteins in the cytoplasm of Escherichia coli by fusion to the bacteriophage lambda head protein D.* Gene, **1998**, 224, S. 45-52.
180. Seedorf, H., Fricke, W. F., Veith, B., Bruggemann, H., Liesegang, H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J., Li, F., Hagemeyer, C., Thauer, R. K. und Gottschalk, G. *The genome of Clostridium kluyveri, a strict anaerobe with unique metabolic features.* Proc Natl Acad Sci U S A, **2008**, 105, S. 2128-2133.
181. Reitz, S., Çebi, M., Reiss, P., Studnik, G., Linne, U., Koert, U. und Essen, L. O. *On the Function and Structure of Synthetically Modified Porins.* Angew Chem Int Ed Engl, **2009**, 48, S. 4853-4857.
182. Martin, D. D., Xu, M. Q. und Evans, T. C., Jr. *Characterization of a naturally occurring trans-splicing intein from Synechocystis sp. PCC6803.* Biochemistry, **2001**, 40, S. 1393-1402.
183. Ludwig, C., Schwarzer, D. und Mootz, H. D. *Interaction studies and alanine scanning analysis of a semi-synthetic split intein reveal thiazoline ring formation from an intermediate of the protein splicing reaction.* J Biol Chem, **2008**, 283, S. 25264-25272.
184. Mercure, S., Lafontaine, D., Ananvoranich, S. und Perreault, J. P. *Kinetic analysis of delta ribozyme cleavage.* Biochemistry, **1998**, 37, S. 16975-16982.
185. Çebi, M. *Synthese und Modifikation von Hybridionenkanälen.* Dissertation, **2008**, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg, Bibliothek Chemie: Y 1699
186. Brenzel, S., Çebi, M., Reiss, P., Koert, U. und Mootz, H. D. *Expanding the scope of protein trans-splicing to fragment ligation of an integral membrane protein: towards modulation of porin-based ion channels by chemical modification.* Chembiochem, **2009**, 10, S. 983-986.
187. Chan, T. R., Hilgraf, R., Sharpless, K. B. und Fokin, V. V. *Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis.* Org Lett, **2004**, 6, S. 2853-2855.
188. Meldal, M. und Tornøe, C. W. *Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition.* Chem Rev, **2008**, 108, S. 2952-3015.
189. Speers, A. E. und Cravatt, B. F. *Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods.* Chem Biol, **2004**, 11, S. 535-546.
190. Surrey, T. und Jähnig, F. *Refolding and oriented insertion of a membrane protein into a lipid bilayer.* Proc Natl Acad Sci U S A, **1992**, 89, S. 7457-7461.
191. Rosenbusch, J. P. *Characterization of the major envelope protein from Escherichia coli. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecyl sulfate binding.* J Biol Chem, **1974**, 249, S. 8019-8029.

192. Baslé, A., Qutub, R., Mehrazin, M., Wibbenmeyer, J. und Delcour, A. H. *Deletions of single extracellular loops affect pH sensitivity, but not voltage dependence, of the Escherichia coli porin OmpF*. Protein Eng Des Sel, **2004**, 17, S. 665-672.
193. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. und Bairoch, A. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server in The Proteomics Protocols Handbook*, J. M. Walker (Editor), **2005**, Humana Press, S. 571-607 (www.expasy.org/tools/peptide-mass.html).
194. Eisele, J. L. und Rosenbusch, J. P. *In vitro folding and oligomerization of a membrane protein. Transition of bacterial porin from random coil to native conformation*. J Biol Chem, **1990**, 265, S. 10217-10220.
195. Schindler, M. und Rosenbusch, J. P. *Structural transitions of porin, a transmembrane protein*. FEBS Lett, **1984**, 173, S. 85-89.
196. Park, K., Perczel, A. und Fasman, G. D. *Differentiation between transmembrane helices and peripheral helices by the deconvolution of circular dichroism spectra of membrane proteins*. Protein Sci, **1992**, 1, S. 1032-1049.
197. Visudtiphole, V., Thomas, M. B., Chalton, D. A. und Lakey, J. H. *Refolding of Escherichia coli outer membrane protein F in detergent creates LPS-free trimers and asymmetric dimers*. Biochem J, **2005**, 392, S. 375-381.
198. Jeanteur, D., Schirmer, T., Fourel, D., Simonet, V., Rummel, G., Widmer, C., Rosenbusch, J. P., Pattus, F. und Pages, J. M. *Structural and functional alterations of a colicin-resistant mutant of OmpF porin from Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1994**, 91, S. 10675-10679.
199. De Pinto, V., al Jamal, J. A., Benz, R., Genchi, G. und Palmieri, F. *Characterization of SH groups in porin of bovine heart mitochondria. Porin cysteines are localized in the channel walls*. Eur J Biochem, **1991**, 202, S. 903-911.
200. Nichols, N. M., Benner, J. S., Martin, D. D. und Evans, T. C., Jr. *Zinc ion effects on individual Ssp DnaE intein splicing steps: regulating pathway progression*. Biochemistry, **2003**, 42, S. 5301-5311.
201. Sun, P., Ye, S., Ferrandon, S., Evans, T. C., Xu, M. Q. und Rao, Z. *Crystal structures of an intein from the split dnaE gene of Synechocystis sp. PCC6803 reveal the catalytic model without the penultimate histidine and the mechanism of zinc ion inhibition of protein splicing*. J Mol Biol, **2005**, 353, S. 1093-1105.
202. Chong, S., Williams, K. S., Wotkowicz, C. und Xu, M. Q. *Modulation of protein splicing of the Saccharomyces cerevisiae vacuolar membrane ATPase intein*. J Biol Chem, **1998**, 273, S. 10567-10577.
203. Booth, P. J. und Curnow, P. *Membrane proteins shape up: understanding in vitro folding*. Curr Opin Struct Biol, **2006**, 16, S. 480-488.
204. Bredin, J., Saint, N., Mallea, M., De, E., Molle, G., Pages, J. M. und Simonet, V. *Alteration of pore properties of Escherichia coli OmpF induced by mutation of key residues in anti-loop 3 region*. Biochem J, **2002**, 363, S. 521-528.
205. Baslé, A. und Delcour, A. H. *Regulation of Bacterial Porin Function in Bacterial and Eukaryotic Porins*, R. Benz (Editor), **2004**, Wiley-VCH, S. 79-98.
206. Eppens, E. F., Saint, N., Van Gelder, P., van Boxtel, R. und Tommassen, J. *Role of the constriction loop in the gating of outer membrane porin PhoE of Escherichia coli*. FEBS Lett, **1997**, 415, S. 317-320.
207. Phale, P. S., Schirmer, T., Prilipov, A., Lou, K. L., Hardmeyer, A. und Rosenbusch, J. P. *Voltage gating of Escherichia coli porin channels: role of the constriction loop*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1997**, 94, S. 6741-6745.
208. Bainbridge, G., Mobasheri, H., Armstrong, G. A., Lea, E. J. und Lakey, J. H. *Voltage-gating of Escherichia coli porin: a cystine-scanning mutagenesis study of loop 3*. J Mol Biol, **1998**, 275, S. 171-176.
209. Schabert, F. A., Henn, C. und Engel, A. *Native Escherichia coli OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy*. Science, **1995**, 268, S. 92-94.
210. Müller, D. J. und Engel, A. *Voltage and pH-induced channel closure of porin OmpF visualized by atomic force microscopy*. J Mol Biol, **1999**, 285, S. 1347-1351.
211. Saint, N., Lou, K. L., Widmer, C., Luckey, M., Schirmer, T. und Rosenbusch, J. P. *Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. II. Functional characterization*. J Biol Chem, **1996**, 271, S. 20676-20680.
212. Schulz, G. E. *The Structure of General Porins in Bacterial and Eukaryotic Porins*, R. Benz (Editor), **2004**, Wiley-VCH, S. 25-40.
213. Nestorovich, E. M., Danelon, C., Winterhalter, M. und Bezrukov, S. M. *Designed to penetrate: time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2002**, 99, S. 9789-9794.
214. Danelon, C., Nestorovich, E. M., Winterhalter, M., Ceccarelli, M. und Bezrukov, S. M. *Interaction of zwitterionic penicillins with the OmpF channel facilitates their translocation*. Biophys J, **2006**, 90, S. 1617-1627.
215. Iyer, R., Wu, Z., Woster, P. M. und Delcour, A. H. *Molecular basis for the polyamine-ompF porin interactions: inhibitor and mutant studies*. J Mol Biol, **2000**, 297, S. 933-945.
216. Suenaga, A., Komeiji, Y., Uebayasi, M., Meguro, T., Saito, M. und Yamato, I. *Computational observation of an ion permeation through a channel protein*. Biosci Rep, **1998**, 18, S. 39-48.

217. Danelon, C., Suenaga, A., Winterhalter, M. und Yamato, I. *Molecular origin of the cation selectivity in OmpF porin: single channel conductances vs. free energy calculation*. Biophys Chem, **2003**, 104, S. 591-603.
218. Danelon, C. und Winterhalter, M. *Reconstitution of General Diffusion Pores from Bacterial Outer Membranes in Bacterial and Eukaryotic Porins*, R. Benz (Editor), **2004**, Wiley-VCH, S. 99-117.
219. Reitz, S. *Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von hybriden OmpF-Poren*. Dissertation, **2009**, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg, Bibliothek Chemie: Y 1708
220. Schmitt, E. K., Vrouenraets, M. und Steinem, C. *Channel activity of OmpF monitored in nano-BLMs*. Biophys J, **2006**, 91, S. 2163-2171.
221. Lindemann, M. und Winterhalter, M. *Membrane channels as a tool to control nanoreactors*. IEE Proc Nanobiotechnol, **2006**, 153, S. 107-111.
222. Zhang, F., Aravanis, A. M., Adamantidis, A., de Lecea, L. und Deisseroth, K. *Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems*. Nat Rev Neurosci, **2007**, 8, S. 577-581.
223. De Pinto, V. und Messina, A. *Gene Family Expression and Multitopological Localization of Eukaryotic Porin/Voltage Dependent Anion-selective Channel (VDAC): Intracellular Trafficking and Alternative Splicing in Bacterial and Eukaryotic Porins*, R. Benz (Editor), **2004**, Wiley-VCH, S. 309-337.
224. Miedema, H., Vrouenraets, M., Wierenga, J., Meijberg, W., Robillard, G. und Eisenberg, B. *A biological porin engineered into a molecular, nanofluidic diode*. Nano Lett, **2007**, 7, S. 2886-2891.
225. Bayley, H., Cronin, B., Heron, A., Holden, M. A., Hwang, W. L., Syeda, R., Thompson, J. und Wallace, M. *Droplet interface bilayers*. Mol Biosyst, **2008**, 4, S. 1191-1208.

Anhang

A1 Beschreibung der Proteine

Nr.	Protein	MW	Plasmid	Vektor	Resistenz
1	MBP- <i>Ssp</i> DnaB ^N -FKBP-His ₆	69221,4	pSB13	pTrc99a	Amp ¹⁰⁰
2	MBP-FRB- <i>Ssp</i> DnaB ^C -His ₆	61275,1	pSB15	pMAL-c2x	Amp ¹⁰⁰
6	MBP- <i>Ssp</i> DnaB ^N -His ₆	56277,7	pTK56	pTrc99a	Amp ¹⁰⁰
7	MBP- <i>Ssp</i> DnaB ^C -His ₆	49993,1	pTK55	pMAL-c2x	Amp ¹⁰⁰
11	MBP- <i>Sce</i> VMA ^N -His ₆	78553,9	pHM41	pTrc99a	Amp ¹⁰⁰
11a	MBP- <i>Sce</i> VMA ^N C1A-His ₆	78521,8	pHM81	pTrc99a	Amp ¹⁰⁰
12	MBP- <i>Sce</i> VMA ^C -His ₆	63933,1	pHM45	pMAL-c2x	Amp ¹⁰⁰
16	MBP- <i>Ckl</i> PTerm-FKBP-His	104590,2	pSB51	pTrc99a	Amp ¹⁰⁰
19	OmpF(1-30)- <i>Psp</i> Pol ^N -His ₆	54841,1	pSB27	pET-11c	Amp ¹⁰⁰
20	His ₁₀ - <i>Psp</i> Pol ^C -OmpF(31-340)	47831,7	pSB24	pET-16b	Amp ¹⁰⁰
21	OmpF(1-26)-LEA- <i>Psp</i> Pol ^N -His ₆	54740,1	pSB28	pET-11c	Amp ¹⁰⁰
22	His ₁₀ - <i>Psp</i> Pol ^C -SGL-OmpF(27-340)	48503,3	pSB37	pET-16b	Amp ¹⁰⁰
26	OmpF	37084,5	pSB40	pET-11c	Amp ¹⁰⁰
29	OmpF(1-26) K16C-LEA- <i>Psp</i> Pol ^N C351A-His ₆	54683,0	pSB44	pET-11c	Amp ¹⁰⁰
32	OmpF K16C	37059,5	pSB42	pET-11c	Amp ¹⁰⁰
33	OmpF G119C	37130,6	pSB46	pET-11c	Amp ¹⁰⁰
34	His ₁₀ - <i>Psp</i> Pol ^C -SGL-OmpF(27-340) G119C	48549,4	pSB45	pET-16b	Amp ¹⁰⁰
41	Strep-gpD- <i>Ssp</i> DnaB ^C -Cys-Tag	20374,5	pJH01	pET-28a	Kan ⁵⁰

A2 Beschreibung der Oligonucleotid-Sequenzen

Name	Beschreibung	5'→3'-Sequenz
oSB1	5'-Ende von FRB- <i>Sce</i> VMA ^C (<i>Eco</i> RI, <i>Xba</i> I)	ATAGAATTCTCTAGAAATCCTCTGGCATGAG
oSB2	3'-Ende von FRB- <i>Sce</i> VMA ^C (<i>Pst</i> I, nur 84,15 µM)	ATACTGCAGGTCGCAATTGTGCACGACAAC
oSB3	3'-Ende von GFP aus pGFPmut3 (<i>Pst</i> I)	ATACTGCAGGGTGGTCGTAAAGGAGAAGAACTTTTAC
oSB4	3'-Ende von GFP + His ₆ + Stopp-Codon aus pGFPmut3 (<i>Hind</i> III)	TATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTTTGTATAGTTCATCCATGCC
oSB5	Wie oSB2 mit <i>Sce</i> VMA ^C N454A (<i>Pst</i> I)	ATACTGCAGGTCGCATGCGTGCACGACAAC
oSB6	Wie oSB2 mit <i>Sce</i> VMA ^C C+1A	ATACTGCAGGTCGGCATTGTGCACGACAAC
oSB7	Sequenzierprimer für pSB3 und pSB4, komplementär zur His ₆ -Sequenz	ATGGTGATGAGATCTGGATCC
oSB8	Sequenzierprimer für pSB3 und pSB4 komplementär zum C-Term. von MBP	CGATGAAGCCCTGAAAGACG
oSB9	Sequenzierprimer für pSB3 und pSB4, komplementär zum C-Terminus von F _M	GATTATGCCTATGGTGCCAC
oSB10	5'-Ende von F _M (<i>Xba</i> I)	AAATCTAGAGGAGTGCAGGTGGAAAC
oSB11	5'-Ende von <i>Ssp</i> DnaE ^N (<i>Eco</i> RI)	ATAGAATTCTGCCTCAGTTTTGGCACCG
oSB12	3'-Ende von <i>Ssp</i> DnaE ^N (<i>Xba</i> I)	ATATCTAGAACACCTTTAATTGTCCCAGCGTCAAG
oSB13	5'-Ende von <i>Ssp</i> DnaE ^C (<i>Spe</i> I)	ATAAACTAGTGGTGGTATGGTTAAAGTTATCGGTCGTCTG
oSB14	3'-Ende von <i>Ssp</i> DnaE ^C (<i>Hind</i> III)	ATAAAGCTTAATGGTGATGATGGTGGTGTCTCTGCAGACAATTGGCGGCGATCGCCC
pTrec-His-RP	Sequenzierprimer (GATC) für pSB19	CTGATTTAATCTGTATCAGG
oHM118	Mutageneseprimer für <i>Sce</i> VMA ^N K30A	GGTAATAAGGTCATCGGCGCCGATGGCAGACCTCGTGAG
oHM119	Mutageneseprimer für <i>Sce</i> VMA ^N K30A (reverses Komplement)	CTCACGAGGTCTGCCATCGGCGCCCATGACCTTATTACC
oHM120	Mutageneseprimer für <i>Sce</i> VMA ^N V27A (<i>Nco</i> I)	GAGGTTGGTAATAAGGCCATGGGTAAAGATGGCAG
oHM121	Mutageneseprimer für <i>Sce</i> VMA ^N V27A (<i>Nco</i> I, reverses Komplement)	CTGCCATCTTTACCCATGGCCTTATTACCAACCTC
oSB15	5'-Ende der Chitin bindenden Domäne (CBD, <i>Nde</i> I)	ATACATATGACGACAAATCCTGGTGTATCC
oSB16	3'-Ende der Chitin bindenden Domäne (CBD, <i>Bam</i> HI)	ATAGGATCCTTGAAGCTGCCACAAGGCAG

Name	Beschreibung	5'→3'-Sequenz
oSB17	5'-Ende von <i>Ssp</i> DnaB ^C (<i>Bam</i> HI)	AATGGATCCTCTAGTTCACCAGAAATAG
oSB18	3'-Ende von <i>Ssp</i> DnaB ^C + SIRSCG + Stopp-Codon (<i>Hind</i> III)	ATAAAGCTTAACCGCAGGATCTAATACTGTTATGG
oSB19	5'-Ende der PCP-Domäne von TycA (<i>Nde</i> I)	ATACATATGTATGTGCGCGCCGACAAATGC
oSB20	3'-Ende der PCP-Domäne von TycA (<i>Bam</i> HI)	ATAGGATCCAGATCTCGTGGCGACATACTGGGC
oSB 21	5'-Ende des OmpF-Fragments (AS 31-340) (<i>Bam</i> HI)	ATAGGATCCCTCTATGCACATAATAGTTACGGTGGCAATGGCGAC
oSB 22	3'-Ende von OmpF (<i>Hind</i> III)	ATAAAGCTTAGAACTGGTAAACGATACCC
oSB23	5'-des OmpF-Fragments (AS 27-340) + SGL (<i>Bam</i> HI)	ATAGGATCCCTCTATGCACATAATTCAGGCCTCAACGGTGAAAACAGTTACGGTGG
oSB24	5'-Ende von <i>Psp</i> -GBD Pol (<i>Eco</i> RI-Stelle bis AS 537)	ATAGAATTCATGCGTTTTTCCTTTGAC
oSB25	3'-Ende von <i>Psp</i> -GBD Pol (<i>Bam</i> HI)	ATAGGATCCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTCTGTATTCGTAACCTTAAGTTCC
oSB26	5'-Ende von OmpF (<i>Nde</i> I)	ATACATATGGCAGAAATCTATAACAAAGATGG
oSB27	3'-Ende des OmpF-Fragments (AS 1-30) (<i>Kpn</i> I)	ATAGGTACCCATTCTTCCGGTAAAATGCTGTTTTCACCGTTACCCTTGG
oSB28	3'-Ende des OmpF-Fragments (AS 1-26) + LEA (<i>Kpn</i> I)	ATAGGTACCCATTCTTCCGGTAAAATGCTAGCCTCGAGACCCTTGGAATAATGCAGACC
oSB29	3'-Ende des OmpF-Fragments (AS 27-340) N27S + SGL (<i>Bam</i> HI)	ATAGGATCCCTCTATGCACATAATTCAGGCCTCTCTGGTGAAAACAGTTACGGTGGC
oSB30	Mutageneseprimer für OmpF K16C	GTAGATCTGTACGGTTGCGCTGTTGGTCTGCAT
oSB31	Mutageneseprimer für OmpF K16C (reverses Komplement)	ATGCAGACCAACAGCGCAACCGTACAGATCTAC
oSB32	Primer für inverse PCR für OmpF(1-26)-LEASGL-OmpF(27-340) (<i>Nhe</i> I)	ATAGCTAGCGGCCTGAACGGTGAAAACAGTTACGGTG
oSB33	Primer für inverse PCR für OmpF(1-26)-LEASGL-OmpF(27-340) (<i>Nhe</i> I)	ATAGCTAGCTTCCAGACCCTTGGAATAATGCAG
oSB34	Mutageneseprimer für <i>Psp</i> -GBD Pol C351A	CATCTTTGAGAGCCTTGCTGGGACTTTGGCAGAAAC
oSB35	Mutageneseprimer für <i>Psp</i> -GBD Pol C351A (reverses Komplement)	GTTTTCTGCCAAAGTCCCAGCAAGGCTCTCAAAATG
oSB36	Mutageneseprimer für OmpF G119C	GATATGCTGCCAGAATTTTGTTGGTGATACTGCATAC
oSB37	Mutageneseprimer für OmpF G119C (reverses Komplement)	GTATGCAGTATCACCACAAAATTCTGGCAGCATATC
oSB38	Mutageneseprimer für OmpF D221C	CTACTGGTCTGAAGTACTGCGCGAACAACATCTAC
oSB39	Mutageneseprimer für OmpF D221C (reverses Komplement)	GTAGATGTTGTTTCGCGCAGTACTTCAGACCAGTAG

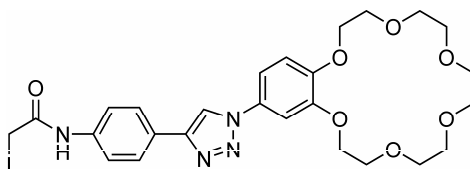
Name	Beschreibung	5'→3'-Sequenz
oSB40	5'-Ende <i>Ckl</i> PTerm + RKN GK (<i>Eco</i> RI)	ATAG <u>AATTC</u> AGGAAAAACGGTAAAGCTTTAG
oSB41	3'-Ende <i>Ckl</i> PTerm + TTLIS (<i>Xba</i> I)	ATAT <u>CTAGA</u> ACTAATAAGGGTAGTATTATGC
oSB42	5'-Ende hGH mit Überlapp zu 3'- <i>Psp</i> -GBD Pol für RF-Klonierung	CCTCTATGCACATAATTCAGGCCTCTTCCCAAC CATTCCCTTAAG
oSB43	3'-Ende hGH mit Überlapp zu Stopp-Codon, <i>Hind</i> III-Stelle von pSB37 für RF-Klonierung	GTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTAGAAGC CACAGCTGCCCTC
oSB44	Insertion Cys-Tag in pSB44 mittels inverser PCR (<i>Nde</i> I)	ATACATATGCATCACCATCACCATCACGGCTGC CTCGAGGCTAGCATTTTACCG
oSB45	Insertion Cys-Tag in pSB44 mittels inverser PCR (<i>Nde</i> I)	ATACATATGTATATCTCCTTCTTAAAG
oSB46	Mutageneseprimer für K179N im Cys-Tag von JZ 35	GTATTAGATCCTGCGGTAACCTTGCGGCCGCAC TCG
oSB47	Mutageneseprimer für K179N im Cys-Tag von JZ 35 (rev. Komplement)	CGAGTGC GGCCGCAAGGTTACCGCAGGATCTA ATAC
oSB48	Mutageneseprimer für <i>Ckl</i> PTerm C381A	GAGTGTACCTGTTAAAGCGATCGCTGTAGAAG ATGAAAA
oSB49	Mutageneseprimer für <i>Ckl</i> PTerm C381A (rev. Komplement)	TTTTCATCTTCTACAGCGATCGCTTTAACAGGT ACACTC
oSB50	Mutageneseprimer für <i>Ckl</i> PTerm N402A, T+1A	CCATACAGCAACGCATGCTGCTACCCTTATTAG TTCTAG
oSB51	Mutageneseprimer für <i>Ckl</i> PTerm N402A, T+1A (rev. Komplement)	CTAGAACTAATAAGGGTAGCAGCATGCGTTGC TGTATGG

Die unterstrichenen Codons enthalten die Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen, die in Klammern angegeben sind. Fett sind die zu mutierenden Codons gedruckt.

A3 Synthetisierte Reagenzien

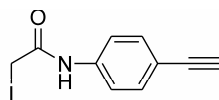
Die aufgeführten Verbindungen **30**, **36** und **39** wurden von Dr. Menekşe Çebi in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Koert an der Philipps-Universität Marburg synthetisiert und als Feststoffe in lichtgeschützter Verpackung zur Verfügung gestellt. Weiterführende Information sind in den Publikationen [185] und [186] zu finden.

*[[(Benzo-18-Krone-6-ether)-1H-[1,2,3]triazol-4-yl]-phenyl]-2-iodacetamid (**30**)*



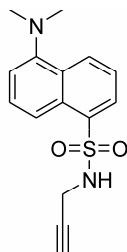
30 (MW 638,5 g/mol)

*N-(4-Ethynylphenyl)-2-iodacetamid (**36**)*



36 (MW 285,1 g/mol)

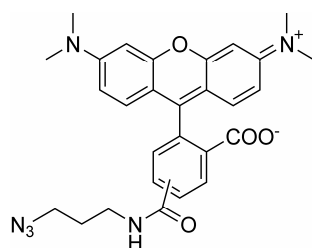
*5-Dimethylamino-N-(2-propinyl)-1-naphthalen-sulfonamid (**39**)*



39 (MW 288,4 g/mol)

Das Rhodaminazid-Reagenz **38** wurde in der Gruppe von Dr. Stephan Sieber an der Ludwig-Maximilians-Universität München synthetisiert und als 32,5 mM Lösung in DMSO zur Verfügung gestellt [189].

*5,6-Carboxytetramethylrhodamin-3-azidopropylamid (**38**)*



38 (MW 512,6 g/mol)

Danksagung

An erster Stelle und ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Henning Mootz danken. Neben der Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe spannende Forschungsprojekte zu bearbeiten und mich von Anfang an zu engagieren, hat er es immer verstanden, mir neue Impulse für die Entwicklung meiner eigenständigen wissenschaftlichen Arbeitsweise zu geben und mich im persönlichen Umgang aufs Neue zu motivieren und meine Begeisterung zu wecken.

Prof. Dr. Lars-Oliver Essen möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie die Unterstützung meiner Arbeit bei der Durchführung des gemeinsamen Kooperationsprojekts danken. Ebenfalls dankend erwähnen möchte ich seine Gastfreundschaft während meines einwöchigen Gastaufenthalts in seiner Arbeitsgruppe.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Ulrich Koert für seine Teilnahme an meiner Prüfungskommission und die kritische Beurteilung meiner Kooperationsbeiträge danken. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Norbert Hamp für seine Bereitschaft, sein Fach in meiner Prüfungskommission zu vertreten.

Einen bedeutenden Beitrag zu meiner Arbeit haben meine Kooperationspartner Dr. Simon Reitz, Dr. Menekşe Çebi und Dr. Philipp Reiß geleistet. Neben den zur Verfügung gestellten Proteinen, Reagenzien und der geleisteten Messzeit, war besonders der trotz der örtlichen Distanz sehr rege persönliche Austausch und die gewonnenen Einblicke in andere Bereiche der Chemie für mich sehr bereichernd. Simon möchte ich außerdem für seine Gastfreundschaft während unserer gemeinsamen Arbeit in seinem Labor danken und Menekşe für die Organisation und Moderation der OmpF-Treffen. Sabrina Hölscher danke ich für die Unterstützung bei der Klonierungsarbeit.

Auf ganz persönliche Weise möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen bedanken, die es täglich geschafft haben, dass der Laboralltag nicht nur von Arbeit bestimmt war. Neben dem fachlichen Diskurs und dem organisatorischen Engagement bleiben mir natürlich die Kaffeerunden und Intermezzi geistiger Sinnfreiheit in Erinnerung, die ganz enorm zur gelungenen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Der Marburger Fraktion danke ich besonders für die enge Zusammenarbeit und Unterstützung während unseres gemeinsamen Umzugs nach Dortmund. Joachim, Tim und Friedel danke ich für die Korrektur meiner Arbeit.

Den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Mohammed Marahiel und Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für die gute Zusammenarbeit und Gastfreundlichkeit während unserer Zeit in Marburg. Meinen Vertiefungs-, Bachelor- und Masterstudenten, besonders Jan-Erik Hoffmann, danke ich für ihre Beiträge zu meiner Arbeit. Henning Seedorf möchte ich für die Bereitstellung der *C. kluyveri* DNA und die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung des *Ckl* PTerm Inteins danken. Francine Perler und Maurice Southworth danke ich für die Plasmide des gespaltenen *Psp*-GBD Pol Inteins, Xiang-Qin Liu für die Bereitstellung des Plasmids pMST, Ralf Koebnik für den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) omp8 und Stephan Sieber für die Anleitung zur Durchführung der Click-Reaktion sowie das zur Verfügung gestellte Rhodaminazid-Reagenz. Uwe Linne möchte ich für die freundliche Unterstützung bei der Massenspektrometrie und Claus Czeslik für den Zugang zum CD-Spektrometer danken.

Dem Graduiertenkolleg 541 der Deutschen Forschungsgemeinschaft „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“ möchte ich für die finanzielle Unterstützung und bereichernden Veranstaltungen sowie den Kontakt zu vielen Doktoranden aus anderen Fachbereichen danken. Der Volkswagenstiftung danke ich für die finanzielle Förderung des Kooperationsprojekts „Synthetic selectivity filters for porin-like ion channels“ zusammen mit den Gruppen von Prof. Dr. Ulrich Koert und Prof. Dr. Lars-Oliver Essen.

Meinen Kommilitonen danke ich für die Mittwochrunde in der Mensa und den Espresso bei Ralf und Andreas. Meinen Freunden danke ich ganz besonders für die gemeinsam verbrachte Zeit, am Lagerfeuer, beim Tatortkochen oder an der Imbissbude, und die vielen schönen Aktionen und Besuche.

Schließlich möchte ich aus ganzem Herzen meiner Familie und meiner Freundin Danke sagen. Es ist schön, dass nicht alle Schlösser aus Sand gebaut sind.